



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

RAMON BOTELHO COSTA

**Síntese e caracterização de nanoemulsões de doxorrubicina e quinizarina com
potencial aplicação sinérgica em Terapia Fotodinâmica em carcinoma
epidermóide oral**

Araraquara, SP

2024

RAMON BOTELHO COSTA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES DE DOXORRUBICINA E
QUINIZARINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO SINÉRGICA EM TERAPIA
FOTODINÂMICA EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo
Coorientadora: Me. Mariza Aires Fernandes

Araraquara, SP

2024

C837s

Costa, Ramon Botelho.

Síntese e caracterização de nanoemulsões de doxorubicina e quinizarina com potencial aplicação sinérgica em terapia fotodinâmica em carcinoma epidermóide oral / Ramon Botelho Costa. – Araraquara, 2024.

67 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

Coorientadora: Mariza Aires Fernandes.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Nanoemulsão. 3. Quinizarina. 4. Doxorubicina. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Fernandes, Mariza Aires, coorient. III. Título.

RAMON BOTELHO COSTA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÕES DE DOXORRUBICINA E
QUINIZARINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO SINÉRGICA EM TERAPIA
FOTODINÂMICA EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Data da defesa: 12 /12 / 2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Professor Dr.Fernando Lucas Primo
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Me. Leonardo Delello Di Filippo
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Ma. Débora Caroline Marques de Souza
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dedico,

Para aqueles que me criaram com amor e me ensinaram com paciência. Pai (Roberto Carlos da Costa) e Mãe (Rosimeire de Lourdes Botelho Costa), a vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Com os mais sinceros sentimentos, agradeço a todos que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada.

A minha família (Roberto Carlos da Costa, Rosimeire de Lourdes Botelho, Ruan Botelho Costa e Shy), que com amor incondicional, sacrifício e dedicação, me guiaram e apoiaram em cada etapa da minha vida. Vocês são a base de tudo o que sou, e suas lições de vida são preciosidades que carrego comigo todos os dias.

Aos familiares, o meu agradecimento também se estende a cada um de vocês, obrigado por tudo.

Aos meus amigos do “Panelinha Formada”, não sei como seria minha graduação sem vocês. Os momentos que compartilhamos carregarei para sempre comigo.

Gabriel, Pedro, Diego, Julia, Leonardo, Guilherme, obrigado por existirem e por serem quem são, o apreço que tenho por vocês é inestimável.

Aos meus professores mestres incansáveis, em especial ao Professor Fernando L. Primo e minha coorientadora Mariza Aires, que com paciência e sabedoria, me ensinaram lições que vão muito além dos livros, e sou grato por tudo.

E, sobretudo, a Deus, por sua constante presença e graça em minha vida.

A todos vocês, minha eterna gratidão. Sei que a vida é feita de ciclos e de momentos. Cada pessoa tem a sua hora e a sua vez de iniciar uma nova fase, e sou feliz em dizer que chegou a minha.

O presente trabalho contou com o financiamento obtido pelo processo nº 2022/11326-6, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Atualmente, os cânceres ainda persistem como uma das doenças que mais causam morte no mundo. Os cânceres orais, são conhecidos pela sua complexidade e capacidade de resistência, estes carcinomas, dificultam o processo de terapia, que geralmente solicita intervenções cirúrgicas associadas a abordagens convencionais, das quais muitas vezes se traduzem em sequelas ou em uma gama de efeitos colaterais, enfatizando a importância da introdução de abordagens terapêuticas alternativas. Assim, o presente trabalho visou o desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões (NE's) como potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD), contando com o potencial arranjo sinérgico promovido pela doxorrubicina (DOX - agente antineoplásico) e quinizarina (QNZ - fotossensibilizador) que foram veiculadas no sistema nanoemulsionado. As NE's foram preparadas pelo processo de ultra-homogeneização com ambos ativos na concentração de 0,05 mg/mL. A caracterização inicial das nanoemulsões por método de dispersão de luz dinâmica (DLS), análise em espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência em modo 2D/3D e teste de eficiência de encapsulação. Através dos resultados observou-se que foram obtidas gotículas em escala nanométrica e monodispersa, com potencial zeta adequado, com leve alteração nas propriedades fotofísicas dos ativos encapsulados em comparação com a forma livre dos mesmos, além da alta taxa de eficiência de incorporação de QNZ (86%) e DOX (95%). Afim de avaliar-se a citotoxicidade dos sistemas desenvolvidos, realizou-se um ensaio de citotoxicidade em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) na ausência de luz, evidenciando efeito citotóxicos nas concentrações utilizadas em monocamada da formulação de NE/DOX (0,2% a 6% em DMEM/SFB 5%) nas primeiras 3 horas, porém, seguida de um reparo celular nas próximas horas, e biocompatibilidade das formulações NE/QNZ e NE/QNZ/DOX (0,1 a 1,4% em DMEM/SFB 5%). Dessa forma, o presente estudo atingiu o objetivo de desenvolver um nanossistema com grande potencial terapêutico para os cânceres orais.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; nanoemulsão; quinizarina; doxorrubicina.

ABSTRACT

Currently, cancers remain among the leading causes of death worldwide. Oral cancers are particularly known for their complexity and resistance, making therapy challenging. Treatment often requires surgical interventions combined with conventional approaches, which frequently result in sequelae or a range of side effects, highlighting the importance of introducing alternative therapeutic approaches. Therefore, this study aimed to develop and characterize nanoemulsions (NEs) as a potential model for application in Photodynamic Therapy (PDT), leveraging the synergistic effects of doxorubicin (DOX - an antineoplastic agent) and quinizarin (QNZ - a photosensitizer) encapsulated within the nanoemulsion system. The NEs were prepared via the ultra-homogenization process, with both active agents at a concentration of 0.05 mg/mL. Initial characterization of the nanoemulsions was conducted using dynamic light scattering (DLS) for particle size analysis, 2D/3D absorption and fluorescence emission spectroscopy, and encapsulation efficiency testing. The results demonstrated that the nanoemulsions produced were nanometric and monodisperse, with a suitable zeta potential, and showed slight alterations in the photophysical properties of the encapsulated active agents compared to their free forms. Additionally, the encapsulation efficiency was high, with QNZ at 86% and DOX at 95%. To assess the cytotoxicity of the developed systems, a cytotoxicity assay was performed on primary neonatal human fibroblasts, HDFn (ATCC® PCS-201-010™), in the absence of light. The results revealed cytotoxic effects in monolayer formulations of NE/DOX (0.2% to 6% in DMEM/5% FBS) within the first 3 hours, followed by cellular repair in the subsequent hours. Meanwhile, the NE/QNZ and NE/QNZ/DOX formulations (0.1% to 1.4% in DMEM/5% FBS) demonstrated biocompatibility. Thus, the present study achieved the goal of developing a nanosystem with great therapeutic potential for oral cancers.

Keywords: photodynamic therapy; nanoemulsion; quinizarin; doxorubicin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Úlceras, lesões e manchas características de cânceres na cavidade oral.....	17
Figura 2 – Estrutura química da Quinizarina (A) e Doxorrubicina (B)	22
Figura 3 – Estrutura das nanogotículas constituintes de uma nanoemulsão do tipo óleo em água.....	24
Figura 4 – Estabilidade da NE/Vazia durante 11 semanas.....	34
Figura 5 – Distribuição do Potencial Zeta da NE/Vazia durante 11 semanas.....	34
Figura 6 – Estabilidade da NE/QNZ durante 11 semanas	35
Figura 7 – Distribuição do Potencial Zeta da NE/QNZ durante 11 semanas	35
Figura 8 – Estabilidade da NE/DOX durante 11 semanas	35
Figura 9 – Distribuição do Potencial Zeta da NE/DOX durante 11 semanas	36
Figura 10 – Distribuição do Potencial Zeta da NE/QNZ/DOX durante 11 semanas.....	36
Figura 11 – Distribuição do Potencial Zeta da NE/QNZ/DOX durante 11 semanas.....	36
Figura 12 – Espectro de absorção no UV-visível da Doxorrubicina e Quinizarina Livres em acetonitrila.....	37

Figura 13 – Perfil dos espectros de emissão de fluorescência no UV-Vis da Doxorubicina em acetonitrila em diferentes concentrações.....	38
Figura 14 – Perfil dos espectros de emissão da Quinizarina em acetonitrila em diferentes concentrações.....	38
Figura 15 – A) Perfil dos espectros de emissão da Doxorubicina Livre em acetonitrila e NE/DOX. B) Perfil dos espectros de emissão da Doxorubicina Livre e NE/DOX normalizados.....	39
Figura 16 – A) Perfil dos espectros de emissão da Quinizarina Livre em acetonitrila e NE/QNZ. B) Perfil dos espectros de emissão da Quinizarina Livre e NE/QNZ normalizados.....	40
Figura 17 – A) Mapa espectral 3D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade. C) Mapa espectral 2D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o segundo maior pico de intensidade.....	41
Figura 18 – A) Mapa espectral 3D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade. C) Mapa espectral 2D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o segundo maior pico de intensidade.....	41
Figura 19 – A) Mapa espectral 3D da Quinizarina Livre, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da Quinizarina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade.....	42
Figura 20 – A) Mapa espectral 3D da NE/QNZ, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da NE/QNZ, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade.....	42

Figura 21 – Curva analítica da Doxorrubicina Livre em acetonitrila, sendo a emissão máxima em 590 nm, com excitação fica em 480 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.	43
Figura 22 – Curva analítica da Quinizarina Livre em acetonitrila, sendo a emissão máxima em 570 nm, com excitação fica em 475 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.....	44
Figura 23 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.....	49
Figura 24 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.....	50
Figura 25 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.....	51
Figura 26 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de doxorrubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.....	52
Figura 27 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de doxorrubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.....	53
Figura 28 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de doxorrubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.....	54
Figura 29 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) e doxorrubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.....	55

Figura 30 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) e doxorubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.....	56
Figura 31 – Ensaio de Citotoxicidade in vitro de quinizarina (QNZ) e doxorubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores obtidos para tamanho de gotícula (TG), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (PZ) (média com os respectivos desvios).....	31
Tabela 2 – Representação dos valores obtidos para Intensidade de fluorescência das amostras digeridas ($IF_{NE\ digerida}$), Intensidade de fluorescência das amostras clarificada ($IF_{Solução\ Cl}$), concentração total do ativo em g/mL (C_t), concentração total do ativo não incorporado em g/mL (C_{NI}), Eficiência de Encapsulação ($E_E(\%)$) e Perda de ativo (P (%)).....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
DOX	Doxorrubicina
QNZ	Quinizarina
SNE	Sistema Nanoestruturado
NE	Nanoemulsão
INCA	Instituto Nacional do Câncer
COCE	Carcinoma Oral de Células Escamosas
TQ	Timoquinona
BTA	Benzotiazol
AQ	Antraquinona
IPD	Índice de Polidispersão
PTX	Paclitaxel
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ACN	Acetonitrila
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
IC	Coeficientes Lineares
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
HDFN	Fibroblastos Humanos Primários
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
PZ	Potencial Zeta
TG	Tamanho da Gotícula
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

O_2	Oxigênio Molecular
ξ	Potencial Zeta
C_T	Concentração Total
C_{NI}	Concentração dos Ativos Não - Incorporados
$C_{Teórica}$	Concentração Total Teórica Incorporada dos Ativos
C_T	Concentração Total obtida dos Ativos
CO_2	Dióxido de Carbono
$IF_{NE\ digerida}$	Intensidade de Fluorescência das Amostra Digeridas
$IF_{Solução\ Cl}$	Intensidade de Fluorescência das Amostras Clarificada
P	Perda de Ativo
$E_i(\%)$	Eficiência de Incorporação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 CÂNCER ORAL E ABORDAGENS CONVENCIONAIS	16
3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	20
3.3.1 Fotossensibilizadores: Quinizarina (QNZ) e Doxorrubicina (DOX)	21
3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: NANOEMULSÕES	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES (NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/DOX/QNZ)	26
4.1.1 Caracterização fotofísica e físico-química do sistema	26
4.1.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta	26
4.1.1.2 Teste da estabilidade das formulações	27
4.1.1.3 Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis: determinação da curva analítica por espectroscopia de fluorescência (QNZ e DOX)	27
4.1.1.4 Eficiência de Incorporação	28
4.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES	29
4.3 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM MONOCAMADA EM HDFn	30
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES (NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/DOX/QNZ)	31
5.2 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA	37
5.3 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO	44
5.4 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM MONOCAMADA EM HDFn	47
6. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Entre os mais diversos tipos de cânceres, o câncer na cavidade oral tem se tornado cada vez mais presente na sociedade brasileira, podendo este fato, ser observado através dos estudos realizados pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), os quais apresentaram como estimativa cerca 15.100 mil casos de cânceres na cavidade oral apenas para o ano de 2024, o que categoriza o mesmo como o oitavo tumor maligno mais incidente no Brasil (INCA, 2024).

Esses tipos de cânceres, constantemente são identificados quando já se apresentam em estado avançado e recorrentes devido aos maus hábitos da população mundial, como o consumo exacerbado de álcool e uso do tabaco (Ghalwash, 2020; Zaroni; Patel, 2020).

A intervenção cirúrgica, acaba por ser o primeiro recurso a ser utilizado para o tratamento do câncer na cavidade oral, principalmente quando o caso se trata de tumores pequenos. Para casos mais avançados ou passíveis de sequela pela intervenção, recursos como a radioterapia e a quimioterapia são frequentemente acionados, mesmo com os graves casos de efeitos colaterais causados (Singh *et al.*, 2018; Schirmacher, 2019; Gabby, Bugin ; Lyons, 2021).

Dentre uma grande variedade de agentes quimioterápicos já identificados, o que permanece sendo o mais usualmente empregado para o tratamento de tumores sólidos, ainda é a doxorrubicina, um agente da classe das antraciclinas, responsável por gerar efeito comprometedor na modulação da expressão gênica como também causar danos na cromatina de células tumorais, induzindo morte celular (Brito *et al.*, 2021).

Entretanto, abordagens convencionais como a quimioterapia, demonstraram inefetividade para muitos casos de carcinoma na epidermóide oral, devido a sua resistência e metástase (Stájer *et al.*, 2020; Saini *et al.*, 2016), obrigando assim, que abordagens convencionais como quimioterapia e radioterapia, sejam frequentemente associadas com ressecção cirúrgica para obtenção de resultados positivos, podendo promover complicações estéticas e funcionais após tratamento além dos efeitos colaterais supracitados (Schirmacher, 2019; Gabby, Bugin ; Lyons, 2021).

Neste contexto, a terapia fotodinâmica (TFD) torna-se uma abordagem alternativa interessante à quimioterapia, da qual, dentre os inúmeros aspectos

interessantes, vale salientar sua característica de ser considerada uma técnica minimamente invasiva, contribuindo com uma queda significativa da taxa de reincidência da doença quando comparada com a ressecções cirúrgicas, além de também poder ser empregada como uma terapia complementar aos tratamentos convencionais. (Kwiatkowski, *et al.*, 2018; Amantino, *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2019).

O mecanismo utilizado na TFD consiste na administração de um fotossensibilizador (FS), o qual tende a se acumular em tecidos patológicos, combinado com a irradiação de uma fonte de luz, em um comprimento de onda específico, desencadeando diversas reações que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), responsáveis pela destruição do tecido em questão (Rivas-sánchez *et al.*, 2021; Sautrot-ba *et al.*, 2020).

Assim, a escolha do FS é de extrema importância para condução da TFD, uma vez que necessitam ser sensíveis à luz para atuarem como fotoiniciadores, como é o caso da quinizarina, que é conhecida por constituir parte dos metabólitos secundários de vegetais, dentro do grupo das antraquinonas, além de possuir efeito sinérgico com outros agentes quimioterápicos, e utilizada para diferentes finalidades por conta de suas diversas atividades biológicas (Rivas-sánchez *et al.*, 2021; Sautrot-ba *et al.*, 2020).

Um ponto interessante para TFD, tem sido a utilização da nanotecnologia como uma ferramenta de aprimoramento, devido a capacidade de algumas nanoestruturas em facilitar a entrega/acúmulo de agentes nos tumores alvos, solucionando questões limitantes nos tratamentos convencionais como alta toxicidade e/ou baixa eficácia de agentes como a doxorrubicina (DOX) ou de algumas antraquinonas quando presentes em altas concentrações (Antonow *et al.*, 2017; Rivas-Sánchez *et al.*, 2021).

Todavia, alguns aspectos importantes para aplicação da técnica e indução do melhor efeito terapêutico, como a escolha do FS, compreensão de sua farmacocinética e farmacodinâmica da dose-resposta e dose-frequência do tratamento, bem como a fonte de luz, ainda não foram bem estabelecidas/padronizadas, para a TFD aplicada ao carcinoma de epidermóide oral, (Chatterjee; Laskar; Chaukar; 2020; Gigliotti; Madathil; Makhoul, 2019), necessitando, portanto de estudos que viabilizem a segurança e a eficácia de algum no arranjo que venha a ser proposto. Assim, a cultura de células em monocamada se apresenta como uma excelente ferramenta por permitir a simulação, análise e

compreensão dos efeitos moleculares, citotóxicos, biofísicos e seus mecanismos existentes (Duval, *et al.*, 2017).

Dessa forma o presente projeto aborda uma proposta que se sustenta em promover um arranjo estável entre o sistema de liberação nanoemulsionado proposto junto da técnica convencional de TFD, permitindo a otimização dos perfis de biodisponibilidade, entrega/acúmulo bem como a queda dos efeitos colaterais devido a menor toxicidade dose-dependente.

Além da potencialização do efeito terapêutico por conta da entrega de DOX associada com o fotossensibilizador quinizarina (QNZ), na perspectiva de promoção de um efeito terapêutico sinérgico e inovador (não foi encontrado nenhuma patente tanto em âmbito nacional como internacional que utilizasse os ativos simultaneamente) dos respectivos componentes, uma vez que, ambos interagem com o DNA, modulando diversos efeitos citotóxicos nas células tumorais, e em processos biológicos desencadeados pelos processos fotodinâmicos (Kozsup *et al.*, 2020; Rivas-sánchez *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, caracterizar e avaliar a citotoxicidade de um nanosistema coloidal (nanoemulsão) como potencial atividade fotobiológica para aplicação em câncer oral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver sistemas nanoemulsionados (SNE) contendo os ativos DOX e QNZ;
- Determinar o tamanho das gotículas, índice de polidispersão e o potencial zeta das nanoemulsões;
- Avaliar a estabilidade das formulações (NE/DOX, NE/QNZ e NE/DOX/QNZ) pelo período de onze semanas;
- Avaliar a incorporação de DOX e QNZ a partir da técnica de espectroscopia de fluorescência;
- Analisar a citotoxicidade das formulações em monocamada em linhagem de HDFn via ensaio de resazurina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CÂNCER ORAL E ABORDAGENS CONVENCIONAIS

O câncer é uma das doenças mais comuns em todo o mundo, podendo ser causado por muitos fatores, como estilo de vida, ambiente (exposições de risco biológico, físico ou químico) e genética, ou seja, ele pode ser acionado de diferentes formas no organismo, sendo possível identificá-lo em todas faixas etárias, classes sociais e etnias, o que torna os mais diversos tipos de estudo para a prevenção, tratamento e diagnósticos, estudos de extrema importância para a atualidade, uma vez em que, os números em relação a recorrência e morte estão se tornando mais expressivos (De oliveira; Cavalcante; Feitosa, 2020; Sung *et al.*, 2021).

Um estudo realizado pelo INCA, corrobora o cenário supracitado, onde cerca de 700 mil novos casos da doença são esperados para a população brasileira entre os anos de 2023-2025. Entretanto, vale ressaltar que para cada tipo de câncer, existe uma problemática diferente, no que diz respeito aos diferentes planos de prevenção, tratamento e diagnósticos. (Ghalwash, 2020; Zanoni; Patel, 2020; INCA, 2024).

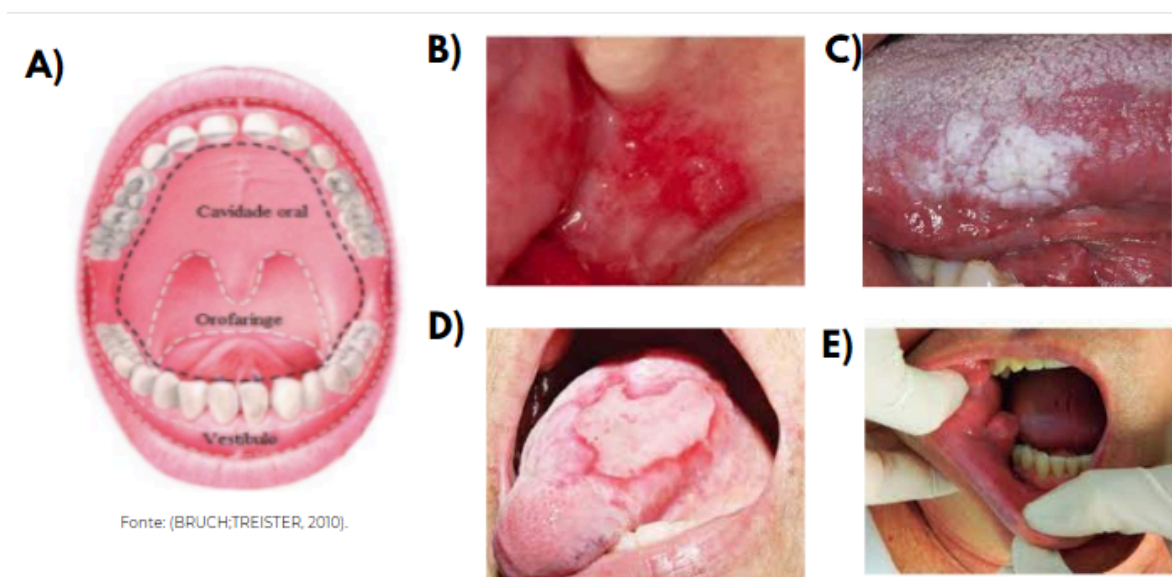
Os cânceres são categorizados por regiões, sendo o câncer oral, um câncer do tipo cabeça e pescoço, representado em cerca de 90% dos casos pelo Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) (Zhang, et al. 2023).

A heterogeneidade de células que compõe o epitélio oral relaciona-se com os diferentes tipos de câncer que podem se desenvolver na cavidade oral, dentre as porções que constituem a cavidade oral, onde a doença é mais comumente encontrada, é na porção da língua e no assoalho bucal, mas esta ainda pode estar presente em outras regiões, como no vestíbulo (região constituída pelos lábios, bochechas e dentes) e na orofaringe onde localiza-se a base da língua e a úvula (De oliveira; Cavalcante; Feitosa, 2020).

Estes, podem ser reconhecidos através de úlceras, lesões e manchas características, nomeadas eritroplasias (um conjunto de manchas avermelhadas que surgem geralmente no assoalho bucal), leucoplasias (um conjunto de manchas e/ou lesões de coloração branca, que surgem com mais frequência na região do vestíbulo), eritroleucoplasia (se apresentam como lesões presente na região da orofaringe e na cavidade bucal, com áreas avermelhadas e esbranquiçadas), massa

exofítica (conjunto de massa que cresce e evidenciasse de maneira externa), como também lesão endofítica (lesões com porção do fundo necrosada e bordas sobressalentes) (Figura 1). Neste sentido, o diagnóstico prévio do câncer oral se torna decisivo para escolha da melhor abordagem terapêutica (Bruch; Treister, 2010; De oliveira; Cavalcante; Feitosa, 2020; Gigliotti, Madathil, Makhoul, 2019).

Figura 1. Úlceras, lesões e manchas características de cânceres na cavidade oral.



A) Regiões da cavidade oral: cavidade oral própria, orofaringe e vestíbulo, B) Eritroplasias (um conjunto de manchas avermelhadas que surgem geralmente no assoalho bucal), C) Leucoplasias (um conjunto de manchas e/ou lesões de coloração branca, que surgem com mais frequência na região do vestíbulo), D) Eritroleucoplasia (se apresentam como lesões presente na região da orofaringe e na cavidade bucal, com áreas avermelhadas e esbranquiçadas), E) massa exofítica (conjunto de massa que cresce e evidenciasse de maneira externa).

Fonte: Autor.

O tratamento de cânceres na cavidade oral, segue as diretrizes indicadas pela Secretaria de Atenção à saúde do Ministério da Saúde, através da Portaria n. 516, de 17 de junho de 2015, onde se tem estabelecido que para casos dos quais se tenha caso precoce de COCE, deve-se realizar a remoção por meio de intervenções cirúrgicas, e no caso de estágios avançados é solicitado uma ressecção cirúrgica com a possibilidade de uma técnica complementar como o caso da radioterapia e quimioterapia (Oliveira; Cavalcante; Feitosa, 2020; Forner *et al.*, 2020).

Todavia, abordagens convencionais, utilizadas no início do tratamento, até conseguem ser efetivas na progressão tumoral em seu estágio inicial. No entanto, é

comum que, após alguns meses, a doença tenha uma reincidência alicerçada a uma resistência aos mesmos medicamentos e/ou terapias realizadas anteriormente (Sha *et al.*, 2021; Biswal *et al.*, 2023).

Entre os mecanismos de resistência desse tipo de câncer, destaca-se o processo de transição epitelial-mesenquimal, no qual as células cancerígenas conseguem alterar suas vias e mecanismos moleculares para assegurar sua resistência aos quimioterápicos e por consequência, a proliferação tumoral. Dessa forma, adquirindo características mesenquimais, em detrimento da perda de sua polaridade celular e as conexões intercelulares estreitas. Entretanto, outros fatores além da transição epitelial-mesenquimal, devem ser levados em conta para compreender a quimiorresistência desse tipo de câncer, como o microambiente tumoral, assim como mudanças genéticas e epigenéticas (Sha *et al.*, 2021; Biswal *et al.*, 2023).

Por conseguinte, vale ressaltar a existência de algumas problemáticas dentro deste cenário apresentado, onde qualquer atraso e necessidade de reagendamento de cirurgias, pode implicar na complicação de diversos quadros clínicos de pacientes devido a perda do momento ideal para ressecções cirúrgicas, assim como aconteceu durante o antigo estado pandêmico (2020 a 2021), da qual houve a diminuição de recursos, sejam eles humanos ou tecnológicos, o que ressalta a importância da adoção e entendimento de técnicas alternativas, além do fato que, abordagens invasivas como intervenções cirúrgicas, costuma/podem causar sequelas funcionais e estéticas (Oliveira; Cavalcante; Feitosa, 2020; Forner *et al.*, 2020).

Outra problemática que surge concomitantemente ao fato supracitado, é a constante necessidade de tratamentos complementares, sendo elas igualmente responsáveis por diversos sequelas e efeitos colaterais. A quimioterapia por exemplo, é responsável por causar prejuízos no sistema imunológico, perda de apetite, distúrbio metabólico, parestesia, paralisia, náuseas, vômitos, ataxia, espasmos, coma, carcinogenicidade, infertilidade entre outros, por conta dos agentes utilizados neste tratamento (Singh *et al.*, 2018; Schirmacher, 2019; Gabby; Bugin; Lyons, 2021).

O problema dessa dinâmica, é que muitos efeitos, não são necessariamente imediatos, podendo ser sentido em diferentes momentos, e trazendo consigo diferentes processos de toxicidade, da qual geralmente observa-se 4 diferentes

níveis, onde o quarto está correlacionado com o risco de vida do paciente (Schirmacher, 2019).

Todavia, estudo por melhores agentes anticancerígenos é uma realidade, trazendo novas propriedades e características para designação dessas substâncias para o mercado. Como é o caso dos estudos realizados nas seguintes substâncias: timoquinona (TQ) (composto presente no óleo essencial de *Nigella sativa* L.) , benzotiazol (BTA) (composto bicíclicos, com inúmeras atividades biológicas como antidiabética, antitumoral e antibacteriana.) e os flavonóides (composto encontrado em vegetais, frutas e seus derivados, que se demonstrou versátil no quesito de modulação de efeitos relacionados ao ciclo celular, eliminação de ERO's e indução de apoptose), sendo elas potências anticancerígenos (Ahmad *et al.*, 2019; Irfan *et al.*, 2020; Kopustinskiene *et al.*, 2020).

Outros estudos relacionados a quimioterapia são em relação a sua dinâmica de distribuição destes mesmos quimioterápicos, o qual houve um estudo que sugeriu um arranjo em que se houvesse uma co-entrega juntamente com siRNA's, para que houvesse uma melhor resposta para com os efeitos terapêuticos, porém por serem processos muito complexos, existe pouca atenção a este sistema sugerido, evidenciando a necessidade de mais e melhores estudos (Wang *et al.*, 2017).

3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um método terapêutico multifuncional, podendo ser utilizado no tratamento de doenças como Alzheimer, oftalmológicos, distúrbios gastrointestinais, dermatológicos, aterosclerose, além de ser eficaz no combate a várias infecções, por meio da inativação de diferentes tipos de microorganismos (Aires-fernandes *et al.*, 2022). A TFD é fundamentada na excitação de um fotossensibilizador (FS) em um determinado comprimento de onda em presença de oxigênio molecular (O_2), na intenção de que exista um estímulo para formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) através de diferentes mecanismos (Silvestre *et al.*, 2021).

Diversos efeitos podem ser observados através da indução de espécies reativas, ofertando diferentes possibilidades e estratégias para a mitigação da progressão tumoral. O mais comum é a citotoxicidade, baseada no acúmulo dessas espécies nas células-alvo com o objetivo de induzir a morte celular por apoptose e

necrose. Todavia, outras metodologias se alicerçam de outros efeitos, como a ativação do sistema imunológico e/ou destruição de vasos sanguíneos (Aires-fernandes *et al.*, 2022).

Dessa forma, a capacidade de fotoativação de um determinado FS, é um processo fundamental para se obter as EROS. Esse fenômeno tem como objetivo fazer com que o FS saia do seu estado fundamental e passe para o estado de singlete excitado, sendo esse estado reversível. Entretanto, outra dinâmica denominada de “cruzamento intersistema”, também pode ocorrer, sendo ela responsável por levar o FS para o estado de tripleto excitado, sendo esse estado igualmente reversível, porém com o tempo de vida menos vertiginoso (Amantino, *et al.*, 2020; Silvestre *et al.*, 2021).

Todo o mecanismo supracitado, distinguem dentre quatro tipos principais tipos de reações, o qual destacam-se as do tipo I e II, as quais requerem oxigênio para sua dinâmica, e utilizam, portanto, as moléculas de oxigênio disponíveis na célula da qual houve o respectivo acúmulo do FS, gerando por consequência a destruição do tecido, através da citotoxicidade gerada pelas EROS (Silvestre *et al.*, 2021).

Neste contexto, a TFD se destaca por ser menos lesiva ou minimamente invasiva para o tratamento de diversos tipos de cânceres, lesões pré-malignas de cabeça e pescoço, bem como na cavidade oral. Adicionalmente, a TFD pode ser uma alternativa aos tratamentos convencionais como a quimioterapia, visto que provoca a morte do tecido tumoral, sem que exista a degradação dos tecidos saudáveis, podendo ser utilizada como terapia complementar, diminuindo a necessidade de ressecções cirúrgicas (Amantino *et al.*, 2020; Kwiatkowski *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019).

3.3.1 Fotossensibilizadores: Quinizarina (QNZ) e Doxorrubicina (DOX)

As antraquinonas (AQ) constituem uma parte dos produtos oriundos do metabolismo secundário de diversas plantas, com diversas aplicações terapêuticas, devido à sua bioatividade. Os compostos representantes das AQ, podem ser incluídos entre duas diferentes classes majoritárias, cujo quais formam a divisão conforme a rota de biossíntese do composto. O primeiro grupo é formado pelas AQ oriundas da via do ácido chiquímico (ácido o - succinilbenzóico) e mevalonato e o segundo grupo, os da via acetato – malonato (Vázquez *et al.*, 2017).

Um exemplo de metabólito da classe das AQ gerado pela rota do ácido chiquímico e do mevalonato, é a quinizarina (1,4-dihidroxi-9,10-antraquinona). Este composto participa do grupo dos derivados de AQ, que no geral, possuem entre si, grande semelhança em suas respectivas estruturas, diversificando-se apenas em relação ao número e posição de algumas ramificações e/ou grupos funcionais, como as hidroxilas, o que acabam por fornecer para cada derivado alguma bioatividade mais direcionada, mas em relação a quinizarina (QNZ), pode-se observar efeitos antimicrobianos, atividades antioxidantes, antitumorais (com baixos índices de citotoxicidade) e aplicação como fotoiniciadores, apesar que para estes dois últimos efeitos, existem poucos relatos de aplicação, seja da QNZ como drogas anticancerígenas ou fotossensibilizadores (Figura 2) (Hu *et al.*, 2019; Rivas-sánchez *et al.*, 2021).

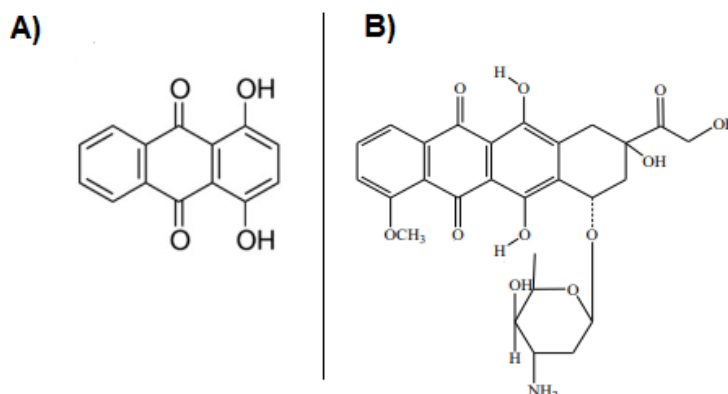
As drogas comumente utilizadas, para tratamento de cânceres, são fármacos anticarcinogênicos da classe das antraciclinas. Nos últimos quinze anos, cerca 32% das pessoas que tiveram câncer de mama, 50-75% dos pacientes idosos que tiveram linfoma e de 50-60% das crianças diagnosticadas com câncer e sobreviveram, foram tratadas com a antraciclina, apesar de que a longo prazo a mesma substância acarreta problemas cardíacos (Kozsup *et al.*, 2020; Rivas-sánchez *et al.*, 2021).

A doxorubicina (DOX) (Figura 2), uma das drogas do grupo das antraciclinas mais amplamente utilizadas, e seu efeito antitumoral está associado à sua capacidade de interferir na expressão gênica, através da inibição da enzima do complexo DNA topoisomerase II. Essa inibição leva a sérios danos na cromatina, ineficiência na transcrição de mRNA's e problemas na replicação do material genético das células tumorais (Kozsup *et al.*, 2020; Rivas-sánchez *et al.*, 2021).

Uma alternativa de abordagem terapêutica para estes tipos de drogas, a fim de superar os problemas associados aos efeito colaterais cardiotoxico (efeito decorrente do fato da droga possuir administração dose-dependente e baixa permeabilidade em tecidos tumorais), é utilizá-las de maneira sinérgica, com derivados dentro do grupo das antraquinonas, dos quais, estudos evidenciaram que a utilização de antraquinonas, associada com a DOX, pode ser eficaz no tratamento do câncer pancreático, além do que algumas moléculas à base de QNZ, já possuem seus efeitos antineoplásicos conhecidos para tratamento de carcinomas,

neuroblastomas e leucemia, conhecidos (Kozsup *et al.*, 2020; Rivas-sánchez *et al.*, 2021).

Figura 2. Estrutura química da Quinizarina (A) e Doxorrubicina (B)



Fonte: adaptado de Ree *et al.*, 2021.

Outro ponto interessante, de grande contribuição sinérgica para a aplicação da TFD, é o desenvolvimento e utilização de sistemas de liberação para o carregamento dos diversos tipos de FS, para administração sistêmica e/ou tópica, melhorando os aspectos relevantes como a biocompatibilidade e biodistribuição (Siqueira-Moura, *et al.* 2009).

Os sistemas de liberação além de permitirem o arranjo supracitado, já foram utilizados para associarem FS com quimioterápicos no objetivo de modular efeitos aprimorados. Um estudo conduzido por Cabral *et al.* (2021), utilizou um sistema nanoemulsionado para associar ftalocianina de cloro alumínio e DOX para experimentação *in vivo* de câncer de mama, o qual obtiveram resultados promissores (Cabra *et al.*, 2021).

3.4 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: NANOEMULSÕES

Um estudo realizado por Ashaolu (2021), indica que a demanda global por recursos oriundos do ramo da nanotecnologia, teve projeção estimada para 80

bilhões de dólares americanos, até o final de 2024, o que justifica a busca pela compreensão e a manipulação das particularidades únicas existentes em sistemas nanoestruturados (SNE) e dos materiais que os constituem, permitem aplicações diversas e singulares em diferentes segmentos do que hoje é compreendido como nanociência (Primo; Tedesco, 2009).

Umas das implicações biológicas mais interessante sobre estes SNE, reside nas suas aplicações terapêuticas, das quais sua capacidade de estabilizar diversos compostos, protegendo-os de serem degradados em meio fisiológico permitem seus respectivos carreamentos, o que acaba por fornecer uma série de resoluções significativas para as problemáticas existentes nos tratamentos convencionais (Porto *et al.*, 2020; Sabir *et al.*, 2021).

A dinâmica de caracterização e escolha das melhores nanoestruturas, proporciona a possibilidade de modulação de um efeito desejável, assim como o aumento da eficiência de entrega/acúmulo destas substâncias nos respectivos sítios alvos, o que aumenta a eficácia de ação destas substâncias, já que possuirão melhorias na farmacocinética de absorção e biodisponibilidade, resultando numa queda da toxicidade, por conta da diminuição do número de doses a ser administrada de um determinado fármaco, que poderá resultar em uma liberação controlada por estes SNE, mantendo a concentração destes, por um tempo prolongado (Porto *et al.*, 2020; Sabir *et al.*, 2021).

A efetividade de entrega de compostos pelos SNE nos sítios de ação, bem como a biodisponibilidade destes, está muito vinculado ao potencial interativo que os SNE possuem com as respectivas substâncias a serem carregadas, podendo elas serem agregados supramoleculares de polímeros e/ou substâncias anfífilas, das quais alguns SNE demonstram ser mais versáteis do que outros, e dessa forma portanto, destacam-se as nanoemulsões (NE), que possuem esse espectro de carregamento anfílico de substâncias, o que as fazem sistemas amplamente utilizados pelas indústrias de ramo farmacêutico, alimentício e cosmético (Porto *et al.*, 2020).

De forma geral as NE são definidas como sistemas termodinamicamente instáveis, isotrópicos, de dois líquidos imiscíveis (usualmente água e óleo), que devem ser estabilizados por compostos tensoativos (proteínas, fosfolipídios, peptídeos, surfactantes micromoleculares e polissacarídeos), quando necessário

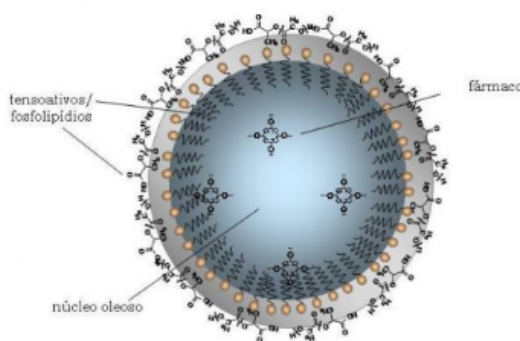
co-tensoativo, localizados na interface óleo/água, formando a fase dispersa e a fase contínua/dispersante (Nirmala *et al.*, 2023).

Os métodos comuns para o preparo de nanoemulsões incluem ultrasonicação, inversão de fase por temperatura, homogeneização em alta pressão, mistura de alto cisalhamento, deslocamento de solvente e emulsificação espontânea, sendo todos classificados em técnicas de baixa ou alta energia (Ashaolu, 2021).

A instabilidade de um sistema nanoemulsionado, pode ser caracterizado por alguns sinais, dentre eles a cremação, floculação, sedimentação e coalescência. Portanto, a escolha e a sequência dos componentes de uma formulação, método de cisalhamento, são fatores cruciais para alcançar NEs estáveis (Ashaolu, 2021).

Na fase dispersa, é onde estão situadas as gotículas nanométricas formadoras da NE, de formato esférico, com carga líquida negativa ou positiva na superfície e tamanho geralmente menor de 200 nm, o que permite que sejam constantemente utilizadas como sistemas de entrega controlada de fármacos em tecidos cancerígenos, já que nanoestruturas entre 100 - 200 nm possuem maior efeito de permeação, entre a má vascularização de carcinomas (Figura 3) (Evangelista *et al.*, 2021; Nirmala *et al.*, 2023).

Figura 3. Estrutura das nanogotículas constituintes de uma nanoemulsão do tipo óleo em água.



Fonte: (Siqueira-Moura, *et al.* 2009).

Formulações baseadas em nanoemulsões (NEs) também têm sido utilizadas para obter um efeito sinérgico entre dois agentes terapêuticos. Um estudo conduzido por Li *et al.* (2022), propões o desenvolvimento de uma nanoemulsão para a

co-entrega de paclitaxel (PTX) e ácido docosahexaenóico (DHA), resultando na redução da progressão tumoral e da toxicidade *in vivo*. (Fernandez-fernandez; Manchanda; Kumari, 2023).

Outro aspecto interessante sobre as NEs, é que elas representam ultimamente cerca de 56% das nanoformulações voltadas para o tratamento de diferentes tipos de câncer (Rodríguez *et al.*, 2022). Além disso, nos últimos anos, mais de 45.000 patentes foram registradas, o qual foi possível identificar mais de 28.000 patentes relacionadas a aplicações oncológicas, conforme estudo de Tenchov *et al.* (2021).

Contudo, um dos grandes desafios no uso de nanoemulsões para o tratamento do câncer está relacionado à complexa fisiopatologia dos tumores e às interações biológicas variadas entre a nanoformulação e o corpo humano. Isso demanda uma compreensão detalhada das respostas celulares, dos processos de adaptação tumoral e da biocompatibilidade (Dordevic *et al.*, 2022; Shan *et al.*, 2022).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES (NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/DOX/QNZ)

As NE foram preparadas a partir do método de ultra-emulsificação como descrito por Siqueira-Moura *et al.* 2009, com algumas modificações e um sistema utilizando dois reatores encamisados para tubo falcon FP50 de fundo cônico de 50 mL, aquecidos a 55°C e agitados por agitadores magnéticos (Corning Stirrer/Hot plate com velocidade de 250 rpm). O agente emulsificante utilizado foi 75 mg de lecitina de soja, da marca comercial Lipoid S100 (Lipoid S. A.) dissolvidos diretamente em 10 mL de acetona grau P.A. a 55 °C e 250 µL miristato de isopropila em um dos reatores, formando a fase orgânica da NE/Vazia.

Já para as NE/QNZ, NE/DOX e NE/QNZ/DOX, o preparo da fase orgânica apresenta uma leve diferença, da qual os 250 µL miristato de isopropila, contiveram 0,5 mg de QNZ, 0,5 mg de DOX ou ambos previamente dissolvidos respectivamente. Com a fase orgânica preparada, adicionou -se a mesma sob gotejamento (velocidade de 1,0 g/s) sobre o outro reator que continha uma solução aquosa contendo 75 mg de Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich Co, MO, EUA), previamente dissolvidos em 20 mL de água milliQ.

A medida em que ocorria o processo de nanoemulsificação, da qual empregou-se a ultra-homogeneização por meio de um ultra-turrax (modelo IKA T25) operado com agitação 12.000 rpm por 5 minutos, a temperatura permaneceu constante de 55°C. Após o período citado, a formulação passou pela fase de remoção do solvente, por meio de um rotaevaporador (BÜCHI, Waterbath B-481), operando sob pressão de 200 mbar, banho a 55°C±5 e rotação de 200 rpm por 10 minutos, para que a formulação fosse concentrada em 10 mL.

4.1.1 Caracterização fotofísica e físico-química do sistema

4.1.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

Para caracterização físico-química, foi utilizado a análise para determinação de tamanho de gotícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersão (IPD) e o potencial Zeta (ξ) das nanoemulsões, na ausência e presença dos ativos (QNZ e DOX). As análises foram realizadas seguindo os procedimentos operacionais padrões do equipamento Zetasizer®, da Malvern, gentilmente cedido pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

4.1.1.2 Teste da estabilidade das formulações

Após o preparo das formulações, análises semanais foram realizadas durante 11 semanas para obtenção dos seguintes parâmetros físico-químicos: tamanho de gotícula (diâmetro hidrodinâmico médio), índice de polidispersidade e potencial Zeta (ξ) conforme descrito no tópico 4.1.1.1. As formulações foram armazenadas em refrigerador com temperatura de 2-8°C durante todo o período de análise.

4.1.1.3 Espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis: determinação da curva analítica por espectroscopia de fluorescência (QNZ e DOX)

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência da QNZ livre e DOX livre, assim como os espectros da NE/QNZ e NE/DOX, foram determinados no estado estacionário utilizando espectrofotômetro GENESYS 10S UV-Vis (ThermoFisher Scientific) e espectrofluorímetro RF 6000 (Shimadzu, Alemanha),

alocados no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP).

Nesta etapa, foi desenvolvida uma curva analítica com número de repetição (n) igual a 3 dos ativos, através de diluições sucessivas (0,50 – 1,75 µg/mL para a DOX e 2,5 - 3,75 µg/mL para QNZ), partindo de uma solução inicial de 50 µg/mL de DOX livre em acetonitrila e de 50 µg/mL de QNZ livre dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), para construção das curvas analíticas em acetonitrila (ACN). Para isso utilizou-se da cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico com duas faces foscas e duas transparentes para avaliar os espectros de absorção, e para análises de fluorescência, a cubeta utilizada também foi a de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico com os quatro lados transparentes.

Os parâmetros espectrais foram previamente determinados por análises de espectroscopia em modo 2D e 3D. As equações obtidas por regressão linear foram calculadas a partir dos valores médios para cada ponto no máximo de emissão. As amostras e as diluições foram preparadas com auxílio de uma microseringa (10,0 µL Hamilton) a partir de diluição infinita em acetonitrila (2,0 mL), diretamente em cubeta de quartzo.

Dessa forma, um protocolo com excitação fixa em 480 nm foi estabelecido da DOX livre e NE/DOX, enquanto para QNZ livre e NE/QNZ foi estabelecido excitação fixa em 475 nm. As análises de varredura de ambas as amostras foram realizadas no espectrofluorímetro RF 6000 (Shimadzu, Alemanha), com tempo de integração de 0,1 s, fendas de excitação e emissão de 5,0/5,0 nm, velocidade de varredura 600 nm/min e faixa leitura foi 300 a 800 nm para análise em 2D.

As análises em 3D também foram realizadas no espectrofluorímetro RF 6000 (Shimadzu, Alemanha), do qual a DOX livre foi analisada com equipamento operando com intervalos de 2 nm, tempo de integração de 0,1 s, excitação iniciando em 400 nm e terminando a 550 nm, emissão iniciando em 550 nm e terminando a 750 nm, fendas de excitação e emissão de 3,0/3,0 nm, velocidade de varredura 6000 nm/min, modificando apenas as fendas de excitação e emissão para 5,0/5,0 nm para leitura da NE/DOX.

A QNZ livre foi analisada com equipamento operando da seguinte forma: tempo de integração de 0,1 s, intervalos de 2 nm, excitação iniciando em 400 nm e terminando a 550 nm, emissão iniciando em 525 nm e terminando a 685 nm, fendas de excitação e emissão de 1,5/3,0 nm, velocidade de varredura 6000 nm/min,

modificando a excitação inicial para 385 nm e terminando a 540 nm emissão inicial para 525 nm e terminando a 685 nm e as fendas de excitação e emissão para 5,0/5,0 nm para leitura da NE/QNZ (Evangelista *et al.*, 2021)

4.1.1.4 Eficiência de Incorporação

Para que fosse possível determinar o conteúdo total de QNZ e DOX presente nas nanoemulsões, 60 µL de NE/QNZ e NE/DOX foi dissolvido em DMSO (1:1, v/v) e sonificados por 5 min para que as NE's fossem digeridas e assim houvesse a liberação dos respectivos ativos encapsulados. Dessa forma, fez-se necessário, a utilização das curvas analíticas preparadas conforme descrito no tópico 4.1.1.3., estas curvas, de QNZ e DOX, forneceram a concentração total (C_T) da quinizarina e da doxorubicina associada à NE após digestão da formulação, que foram diluídas 1:24 em acetonitrila para leitura no espectrofluorímetro.

Em paralelo, uma alíquota de 400µL das amostras de NE/QNZ e NE/DOX, foram separadas, para que assim, a concentração dos ativos QNZ e DOX não incorporados (C_{NI}) pudessem ser quantificados através do clarificado obtido da separação da fase aquosa usando um procedimento de ultrafiltração/ultracentrifugação (Microcon Ultracel YM-100, Millipore, Irlanda) a 13000 × g por 1 h a 4 °C. O clarificado resultante foi diluído em 1:5, para leitura no espectrofluorímetro.

Dessa forma, para o cálculo da eficiência de encapsulação da DOX e QNZ em relação ao sistema nanoestruturado, utilizou-se as curvas analíticas (4.1.1.3) que forneceram dados para a equação, por meio das leituras no espectrofluorímetro. Este parâmetro demonstrou a quantidade real do fármaco encapsulado a NE (Equação 1), levando em consideração as perdas durante o processo experimental de preparo (Equação 2).

$$\text{Eficiência de Encapsulação (\%)} = \frac{C_T - C_{NI}}{C_T} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Perda (\%)} = \left(\frac{C_{Teórica} - C_T}{C_{Teórica}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Sendo,

C_T = refere-se a concentração obtida após digestão da NE/QNZ ou NE/DOX,

C_{NI} = refere-se a concentração dos ativos obtida do clarificado, ou seja, parte do

ativo não-incorporado,

$C_{Teórica}$ = refere-se a concentração de ativo que deveria haver em cada sistema nanoestruturado.

Vale ressaltar que os ensaios foram conduzidos por medição em espectrofluorímetro RF 6000 (Shimadzu, Alemanha), da qual utilizou-se a excitação fixa em 480 nm para DOX Livre e NE/DOX e excitação fixa em 475 nm QNZ Livre e NE/QNZ, como comprimentos de excitação, uma vez em que estes representam comprimento de onda máximo de absorção. As análises foram feitas em triplicata e os resultados médios ($\pm DP$) foram relatados.

4.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

A linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) foi cultivada utilizando-se o protocolo de cultivo padrão.

A linhagem celular de HDFn foi estabelecida em frascos para cultura de 75 cm², utilizando-se o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 0,1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina com soro fetal bovino a 10%. A linhagem foi cultivada até atingir confluência, sendo mantida a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Ao atingir confluência, a linhagem foi tratada com uma solução de tripsina 0,05% Gibco® quando se faz necessário o processo de repique, para assim soltá-las da monocamada. Esse processo de tripsinização, quando realizado, foi interrompido pela adição direta de meio de cultura suplementado, e assim centrifugado a 1800 rpm por 5 minutos, para posterior remoção do sobrenadante, e ressuspensão das células em 10 mL de meio.

4.3 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM MONOCAMADA EM HDFn

Uma vez atingida a confluência, as células foram tripsinizadas duas vezes antes do estudo conforme descrito pela norma internacional ISO 10993-5 para testes de citotoxicidade. A linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn

(ATCC® PCS-201-010™) foi transferida para placas de 96 poços de fundo plano, onde cada poço apresentava uma densidade celular de 3×10^4 células por poço. Na sequência, as células foram incubadas com ausência de fotoestímulo por 24 horas em completo DMEM/SFB 10% a 37°C. Após o tempo estipulado, as células foram incubadas com diferentes concentrações das formulações de NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/QNZ/DOX (6 á 0,2%) diluídas em DMEM/SFB 5%. O teste consistiu em três tempos de exposição, sendo eles 3, 24 e 48 horas. Após o término de cada tempo de exposição dos respectivos poços contendo células representantes a esse tempo, o meio contendo as formulações dos mesmos era descartado e o poços lavados com tampão PBS 1X, para que na sequência, a resazurina foi adicionada a cada poço a uma concentração final de 10 µmol/L (diluição de 100 vezes da solução estoque), sendo assim incubadas por 4 horas, com 5% de CO_2 e a 37°C. A fluorescência (F) foi lida usando comprimento de onda de excitação a 540 nm e comprimento de onda de emissão a 590 nm, em um leitor de placas Bioteck Synergy TM HTX (Evangelista *et al.*, 2021; Malhão *et al.*, 2019).

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES (NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/DOX/QNZ)

Este projeto consistiu no desenvolvimento e caracterização de quatro sistemas nanoemulsionados, sendo eles o sistema sem carreamento do ativo (NE/Vazia), com carreamento da quinizarina (NE/QNZ), com carreamento da doxorrubicina (NE/DOX) e com o carreamento de ambos os ativos (NE/QNZ/DOX). Com o devido preparo das formulações, a etapa subsequente foi a de realizar a caracterização inicial de cada sistema nanoestruturado, por meio do método do espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering – DLS*), sendo este, muito importante para o estudo e análise da manutenção da estabilidade do sistema através do acompanhamento dos seguintes parâmetros: tamanho de gotícula, índice de polidispersividade e carga superficial (Potencial Zeta).

O tamanho médio de gotícula encontrado para as NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/QNZ/DOX, foram de $228,1 \pm 65,7$ nm, $200,9 \pm 34,5$ nm, $208,8 \pm 46,9$

nm e $180,8 \pm 8,3$ nm, respectivamente (Tabela 1 e Figura 4, 6, 8 e 10), o que corresponde a um resultado interessante, já que as nanoemulsões são categorizadas pela composição de gotículas dimensionadas entre 10 a 1000 nm (submicrônica), das quais as que pertencem a faixa de 20 a 200 nm acabam por caracterizar os sistemas mais estáveis, além de que as dimensionadas entre 100 a 200 nm, podem fornecer uma permeação mais efetiva (Kalyane *et al.*, 2019; Theochari, Xenakis, Papadimitriou, 2020).

Tabela 1: Valores obtidos para tamanho de gotícula (TG), índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta (PZ) (média com os respectivos desvios).

Formulação	TG (nm)	IPD	PZ (mV)
NE/Vazia	$228,1 \pm 65,7$	$0,315 \pm 0,059$	$-29,28 \pm 2,57$
NE/QNZ	$200,9 \pm 34,5$	$0,247 \pm 0,046$	$-22,82 \pm 9,05$
NE/DOX	$208,8 \pm 46,9$	$0,269 \pm 0,104$	$-31,20 \pm 2,33$
NE/QNZ/DOX	$180,8 \pm 8,3$	$0,186 \pm 0,134$	$-23,33 \pm 4,1$

Nota: As amostras representam a média e o desvio padrão de onze medições (n = 11).

Fonte: Autor.

Outro ponto importante de se analisar é sobre o valor relativamente alto de desvio padrão obtido em cada valor de tamanho de gotícula. Como é sabido, as nanoemulsões são sistemas essencialmente compostos por água, óleo e algum tensoativo, sendo este último, responsável por fornecer boa parte da estabilidade para o sistema nanoemulsionado, tornando as nanoemulsões um sistema cineticamente estável, mas ainda instável termodinamicamente, podendo assim apresentar separação de fase paulatinamente, mesmo que possuam uma vida útil prolongada por conta dos tensoativos (Abbasian, Zhou, Foudazi, 2022).

Dessa forma, analisar os possíveis mecanismos de desestabilização coloidal, se fazem necessários, uma vez que elas podem decorrer por quatro vias principais conforme descrito pela teoria DLVO, proposta por Derjaguin e Landau e, Verwey e Overbeek, sendo elas: floculação, coalescência, sedimentação e maturação de Ostwald (Abbasian, Zhou, Foudazi, 2022).

Todavia, os fenômenos decorrentes de forças como floculação, coalescência, sedimentação podem ser descartados, no sentido de não serem os principais indutores da significativa variação do tamanho das gotículas. Isso se deve ao fato de que para ocorrer a floculação assim como a coalescência, o sistema depende da agregação e/ou junção de pequenas gotas dos quais estejam próximas, onde uma vez agregadas ou fundidas acabam por promoverem a formação de um filme fino de fase contínua, podendo coalescer para depois flocular ou flocular para depois coalescer, até formar gotículas com densidade muito diferente da fase dispersante e sedimentaram na solução, mas todo esse processo é suprimido, por conta de dois fatores: alta repulsão eletrostática e fornecimento de impedimento estérico, ambos presentes no sistema (Abbasian, Zhou, Foudazi, 2022).

A estabilização do sistema nanoestruturado realizado por intermédio do revestimento de surfactantes iônicos, é muito interessante uma vez em que atuam interagindo com seus respectivos contra-íons formando um ambiente elétrico que induz a estabilidade do sistema, do qual impede que as gotículas interagem por conta de possuírem a mesma carga, dessa forma se repelindo e impossibilitando os fenômenos supracitados (Danaei *et al.*, 2018).

Todo o ambiente eletrônico gerado pelas interações realizadas pelos tensoativos iônicos, acabam por ser um ponto de análise fundamental para se determinar o potencial Zeta de uma NE, sendo que valores próximos a ± 30 mV indicam maior estabilidade. O valor de potencial Zeta encontrado nas NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/QNZ/DOX, foram de $-29,28 \pm 2,57$ mV, $-22,82 \pm 9,05$ mV, $-31,2 \pm 2,33$ mV e $-23,33 \pm 4,10$ respectivamente (Tabela 1 e Figura 5, 7, 9 e 11), valendo ressaltar que a repulsão eletrostática, neste caso foi fornecida pelo Lipoid S100 (tensoativo anfótero), que além de fomentar uma repulsão eletrostática entre as gotículas proporciona um aumento da energia termodinâmica necessária para coalescer, uma vez que oferece também uma barreira estérica entre as gotículas com sua cadeia (Abbasian, Zhou, Foudazi, 2022; Danaei *et al.*, 2018).

Outro tensoativo presente neste sistema nanoemulsionado é o Pluronic F68, que apesar de não ser iônico, também contribui para um impedimento estérico mais efetivo, sendo responsável por inferir duas novas forças estéricas entre gotículas do sistema. Conforme descrito pela teoria DLVO estendida, tensoativos não-iônicos, podem subsidiar a indução de forças estéricas entre gotículas através do decréscimo de entropia do tensoativo, devido a compreensão de suas cadeias que geram por

consequência extenuação elástica, desencadeando uma repulsão elástica entrópica. Outro fenômeno é referente a força que surge por conta do arranjo não favorável das mesmas cadeias quando existe a aproximações destas gotículas, proporcionando pressão osmótica local (Abbasian, Zhou, Foudazi, 2022; Danaei *et al.*, 2018).

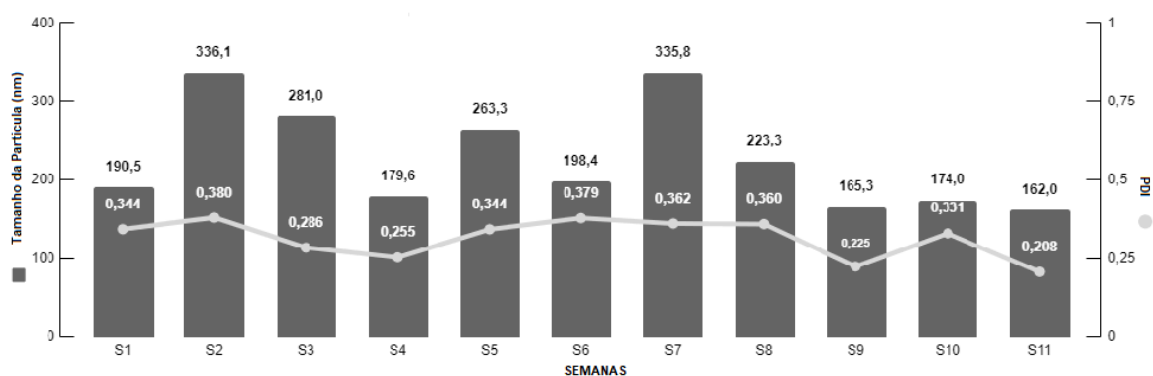
Dessa forma, a maturação de Ostwald é o fenômeno que se apresenta de forma mais plausível para explicar o significativo desvio do tamanho do sistema nanoemulsionado, uma vez em que a maturação de Ostwald é definido pela dinâmica da qual gotículas menores dentro do sistema coloidal, tendem a sofrerem difusão e se organizarem em gotículas maiores, também formando por fim uma fase dispersa através da fase contínua, em sistemas polidispersos (Wilson, 2022; Zielińska *et al.*, 2020).

Esse fato relaciona-se significativamente com as formulações obtidas, uma vez em que, índice de polidispersão (IPD) das NE/Vazia, NE/QNZ, NE/DOX e NE/QNZ/DOX, sofreu uma mudança significativa após a mudança no protocolo de homogeneização e armazenamento antes e após leitura no DLS, o que resultou numa melhora dos resultados onde o novo protocolo prevê uma homogeneização utilizando o vórtex por 1 minuto, antes e após o obtenção da alíquota da formulação para leitura em DLS e o armazenamento não mais realizado em tubo do tipo Falcon, mas sim em frascos de vidro, o que forneceu uma média de IPD $0,315 \pm 0,059$ para as NE/Vazia, $0,247 \pm 0,046$ para as NE/DOX, $0,269 \pm 0,104$ para as NE/QNZ, $0,186 \pm 0,134$ para as NE/QNZ/DOX (Tabela 1 e Figura 4, 6, 8 e 10), explicando assim a diferença de tamanho das gotículas dentro do tempo analisado e consequentemente o desvio (Wilson, 2022; Zielińska *et al.*, 2020).

Em suma, as respectivas distribuições do tamanho de gotícula, apresentaram-se de forma monodispersa conforme os padrões internacionais, os quais caracterizam IPD's superiores a 0,7 como sistemas polidispersos, e mais propensas a maturação de Ostwald, e IPD's menores que 0,5 monodispersas e menos propensas à maturação de Ostwald. Essa categorização realizada conforme a distribuição do tamanho da gotículas, tem sido relacionada não somente como um índice de polidispersão, mas como um importante critério para a aprovação de alguma técnica e/ou estudo na área de nanomedicina pela FDA, das quais sistemas nanoestruturados classificados como monodispersos tendem a possuir um desempenho biológico reprodutível, sendo este um ponto a ser considerado já que o

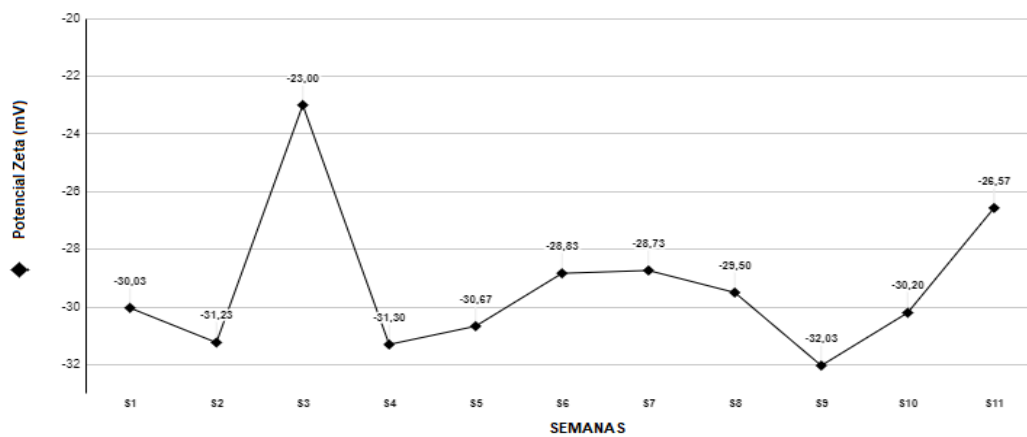
projeto tem a iniciativa de desenvolver um sistema de entrega eficiente para um melhor desenvoltura da fototerapia dinâmica (Danael *et al.*, 2018)

Figura 4. Estabilidade da NE/Vazia durante 11 semanas.



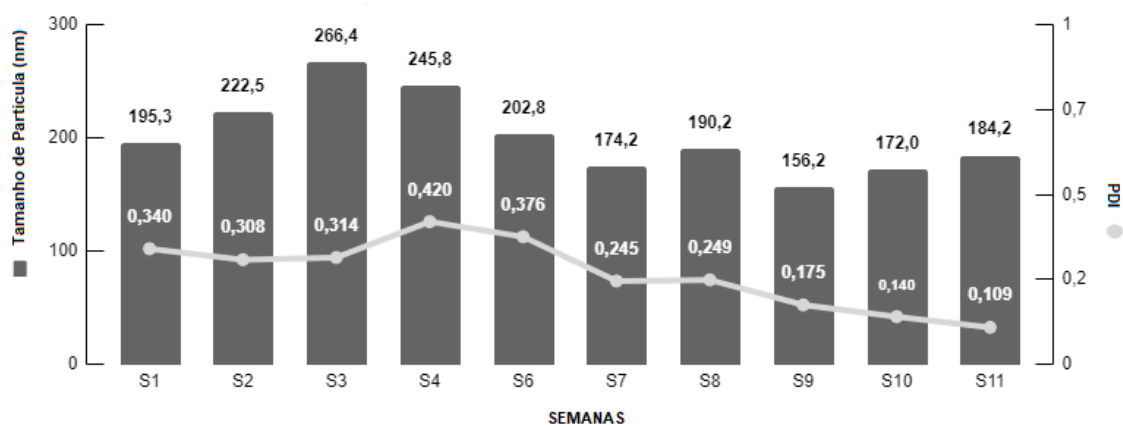
Fonte: Autor.

Figura 5. Distribuição do Potencial Zeta da NE/Vazia durante 11 semanas.



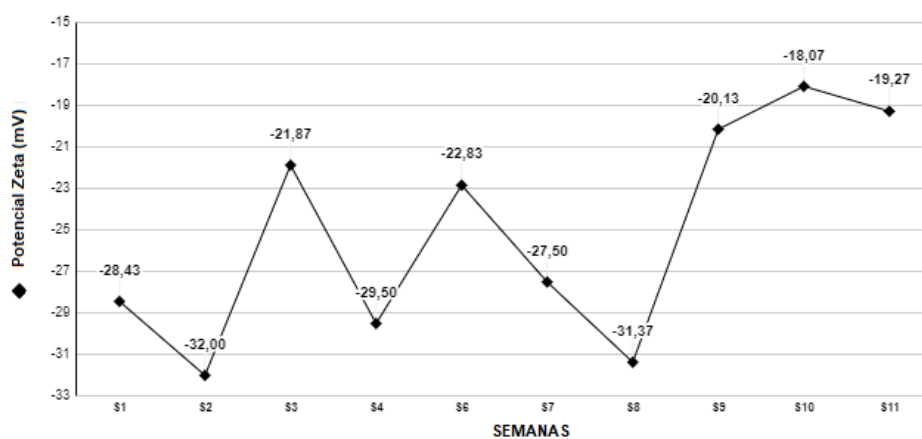
Fonte: Autor

Figura 6. Estabilidade da NE/QNZ durante 11 semanas.



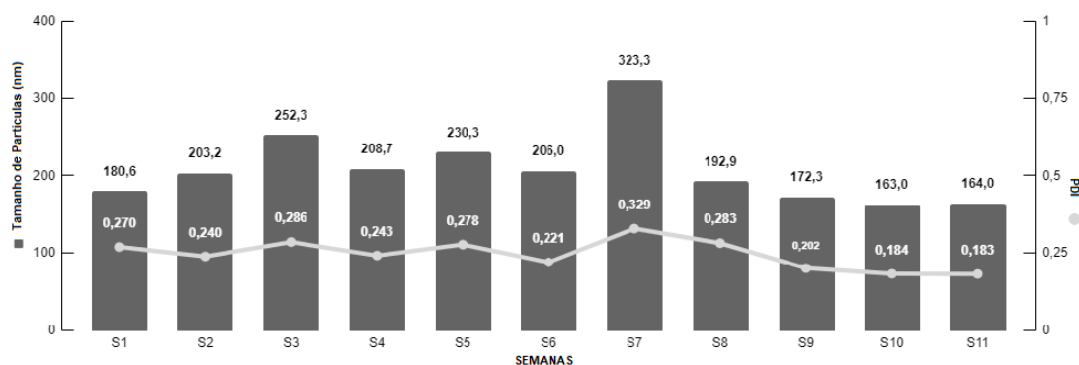
Fonte: Autor

Figura 7. Distribuição do Potencial Zeta da NE/QNZ durante 11 semanas.



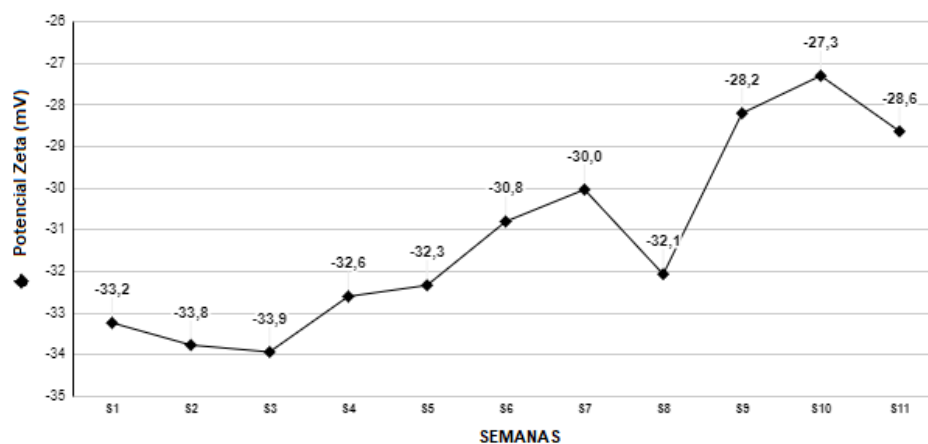
Fonte: Autor

Figura 8. Estabilidade da NE/DOX durante 11 semanas.



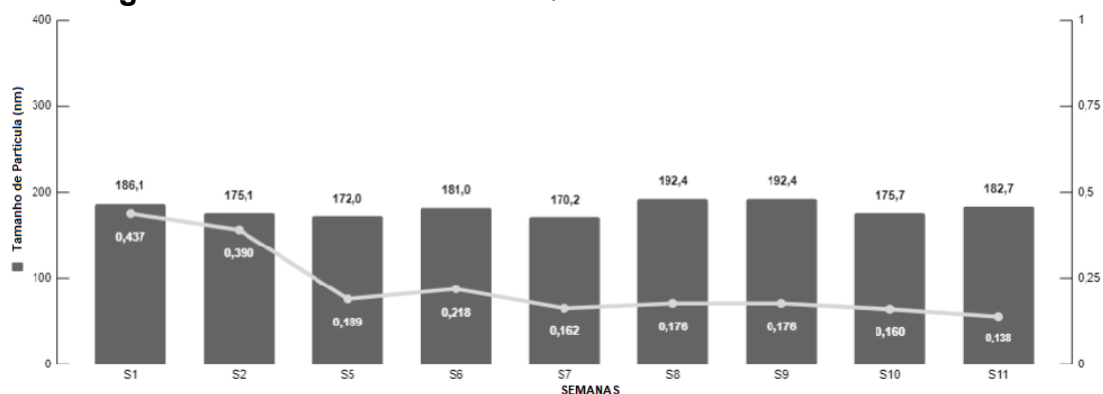
Fonte: Autor

Figura 9. Distribuição do Potencial Zeta da NE/DOX durante 11 semanas.



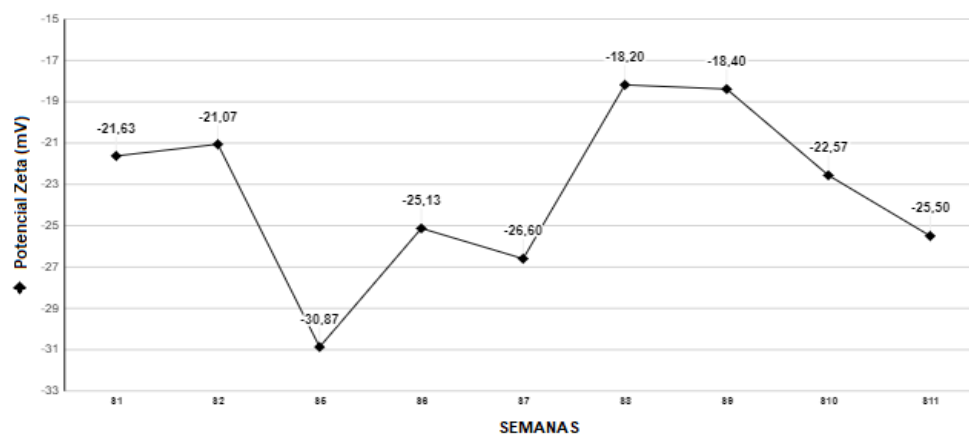
Fonte: Autor

Figura 10. Estabilidade da NE/QNZ/DOX durante 11 semanas.



Fonte: Autor

Figura 11. Distribuição do Potencial Zeta da NE/QNZ/DOX durante 11 semanas.

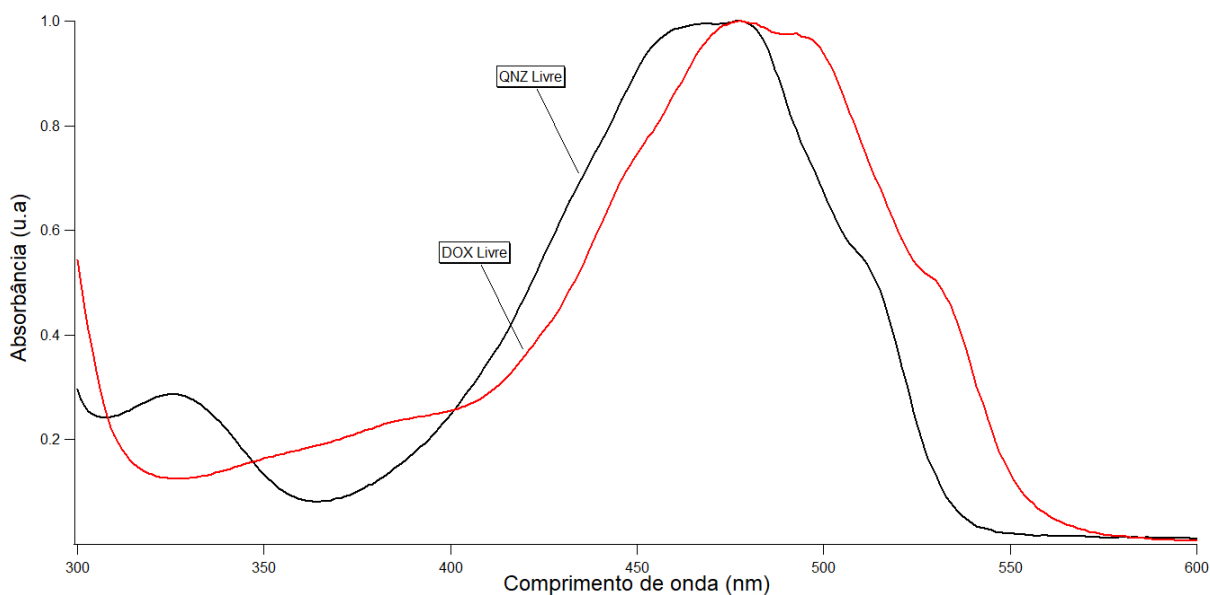


Fonte: Autor

5.2 CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA

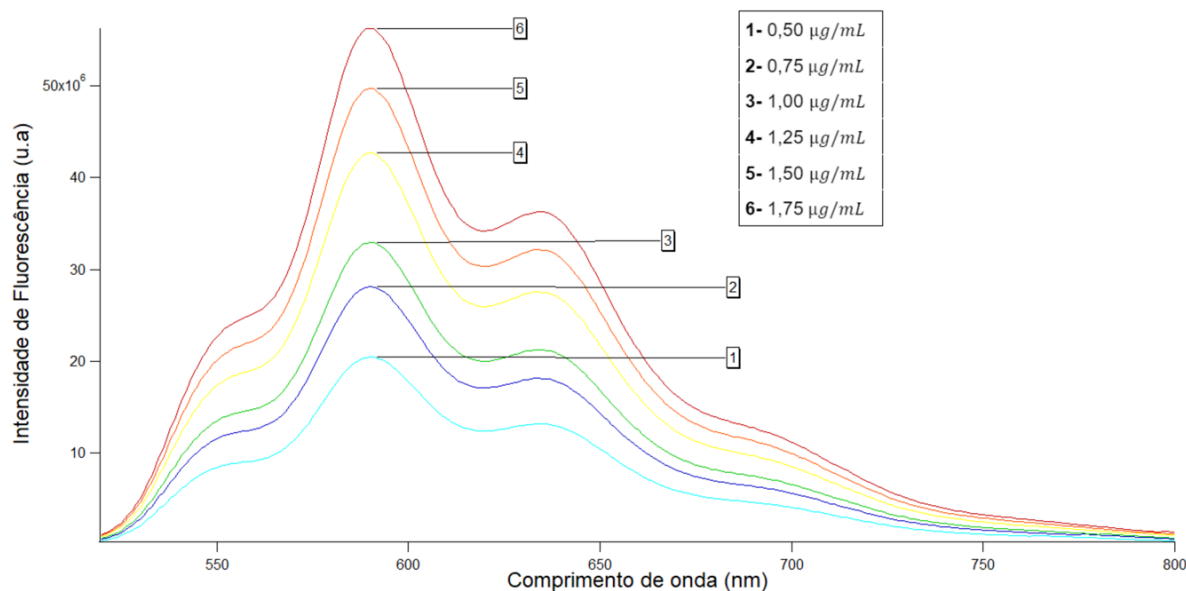
Com o decorrer dos respectivos ensaios descritos no tópico 4.1.1.3, foi possível determinar por análises espectroscópica e espectrofluorimétrica, os valores máximos de absorção e emissão de fluorescência (Figuras 12, 13 e 14) dos ativos. A Doxorubicina apresentou máxima absorção em 480 nm e máxima emissão em 590 nm, enquanto a Quinizarina apresentou máxima absorção em 475 e máxima emissão em 570 nm, sendo estes valores obtidos, muito próximos aos da literatura, onde um trabalho desenvolvido por LIANG, *et al.* 2018, encontrou valores de absorção e emissão máxima em 495/595 nm para DOX livre, e outro trabalho realizado por SAUTROT-BA *et al.*, 2020 que encontrou valores de absorção e emissão máxima em 475/558 nm para QNZ livre.

Figura 12. Espectro de absorção normalizados no UV-visível da Doxorubicina e Quinizarina Livres em acetonitrila.



Fonte: Autor.

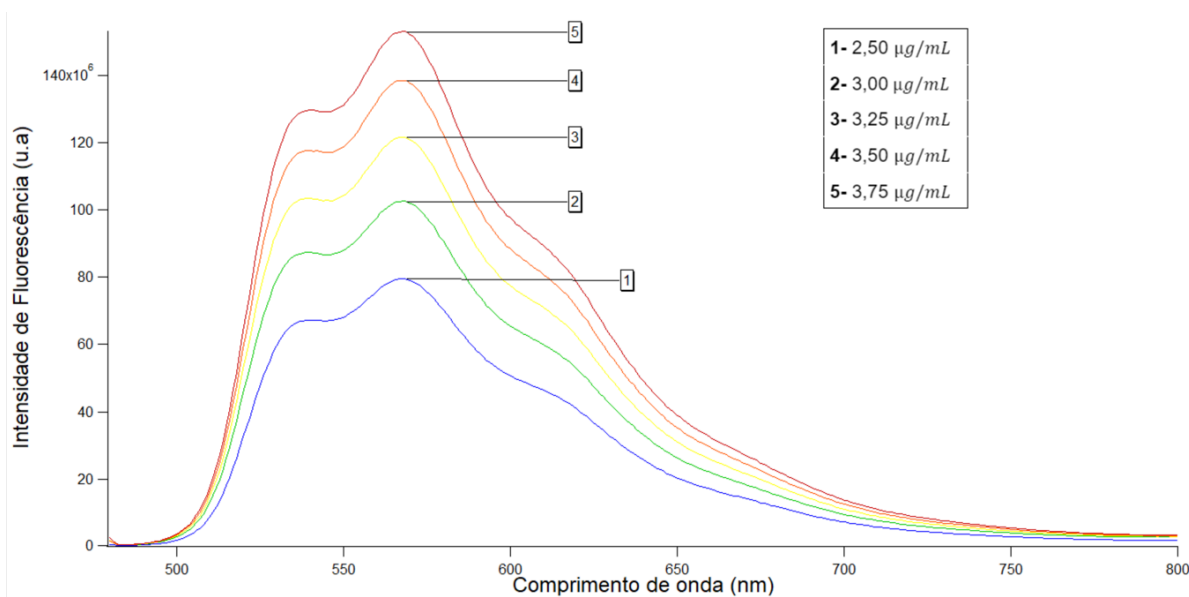
Figura 13. Perfil dos espectros de emissão de fluorescência no UV-Vis da Doxorubicina em acetonitrila em diferentes concentrações.



Emissão máxima em 590 nm, com excitação fica em 480 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.

Fonte: Autor.

Figura 14. Perfil dos espectros de emissão da Quinizarina em acetonitrila em diferentes concentrações.

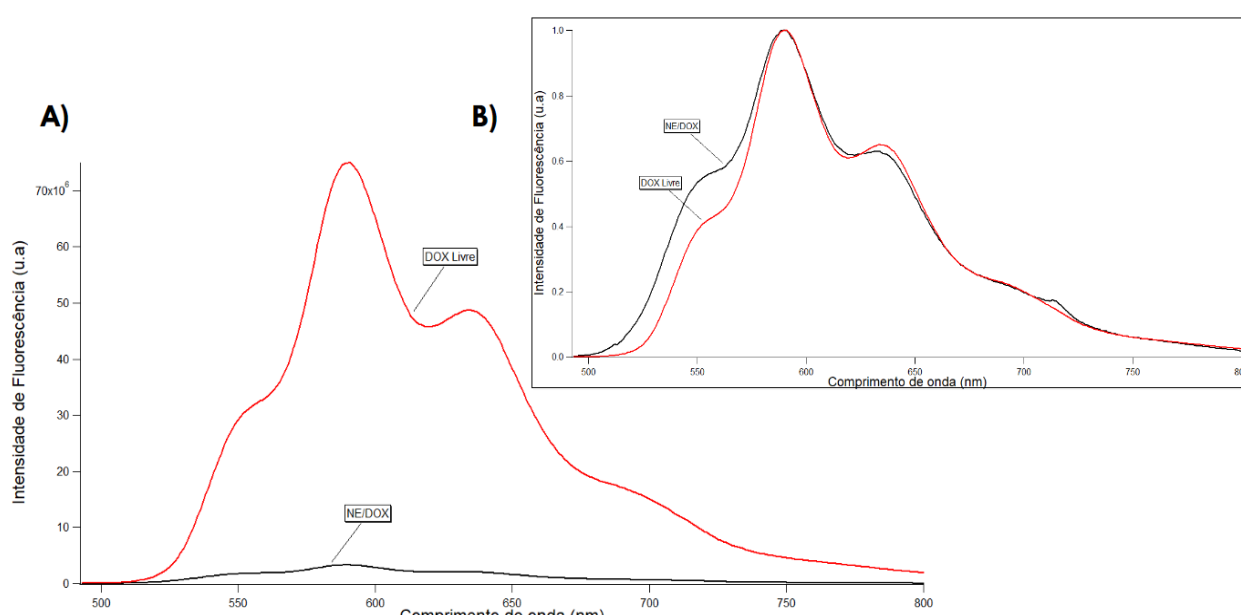


Emissão máxima em 570nm, com excitação fica em 475 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.

Fonte: Autor.

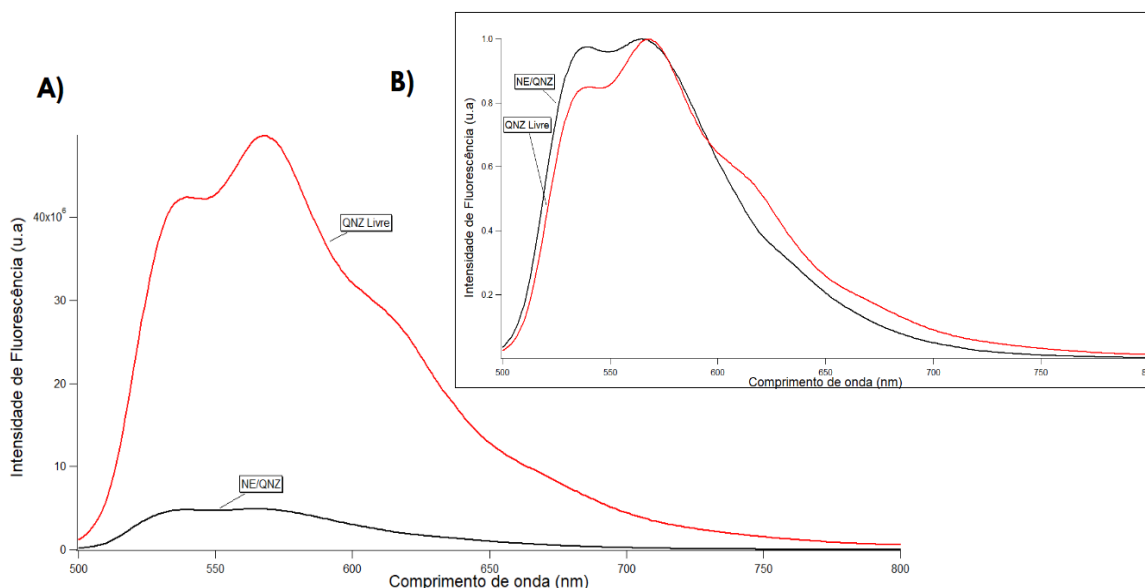
As análises espectrais espectrofluorimétricas não se restringiram apenas aos ativos livres, sendo requisitada para as formulações que os continham encapsulados (NE/QNZ e NE/DOX). Como já se era sabido o ponto de máxima absorção para cada um dos ativos (475 nm para QNZ e 480 nm para DOX), realizou-se a análise espectrofluorimétrica mantendo uma excitação fixa em 475 nm para QNZ e 480 nm para DOX, obtendo-se como resultado notório a permanência dos pontos de emissão de fluorescência no máximo de 570 nm para QNZ e 590 nm para DOX, entretanto foi possível evidência uma queda da intensidade de fluorescência devido ao processo de supressão do grupamento cromóforo de ambos os ativos pelas formulações que as incorporaram. Dessa forma, para facilitar a análise e a visualização do arranjo espectral das formulações afim de comparar com os perfis espectrais originais dos ativo livres, realizou-se o processo de normalização dos dados, o qual possibilitou verificar a existência de um deslocamento sutil no perfil contendo DOX, dos quais a DOX livre que possuía um perfil emissão que variava entre 520 nm - 800 nm, agora incorporada na NE, varia de 500 nm - 800 (Figuras 15 e 16).

Figura 15. A) Perfil dos espectros de emissão da Doxorubicina Livre em acetonitrila e NE/DOX. B) Perfil dos espectros de emissão da Doxorubicina Livre e NE/DOX normalizados



Fonte: Autor.

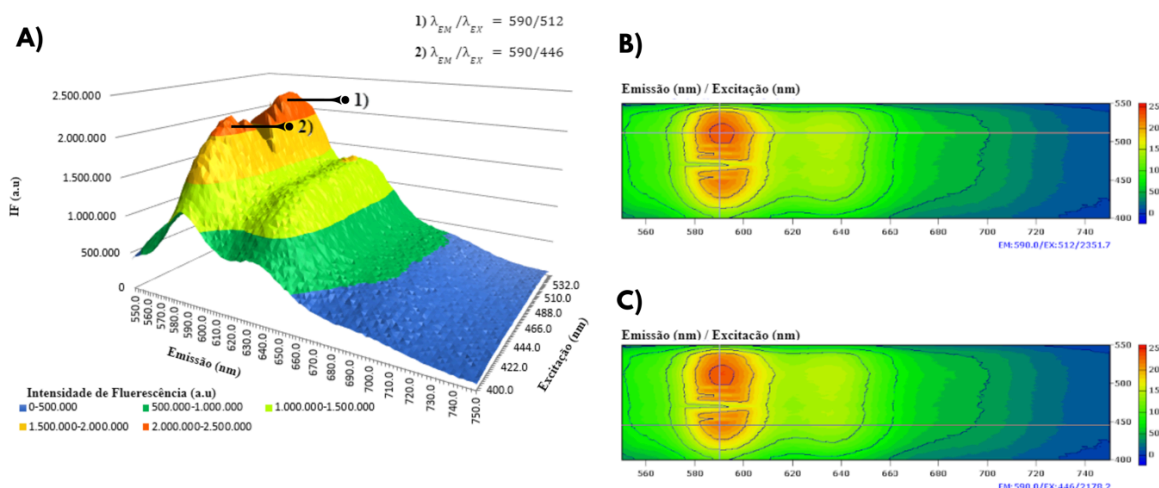
Figura 16. A) Perfil dos espectros de emissão de fluorescência da Quinizarina Livre em acetonitrila e NE/QNZ. B) Perfil dos espectros de emissão da Quinizarina Livre e NE/QNZ normalizados.



Fonte: Autor

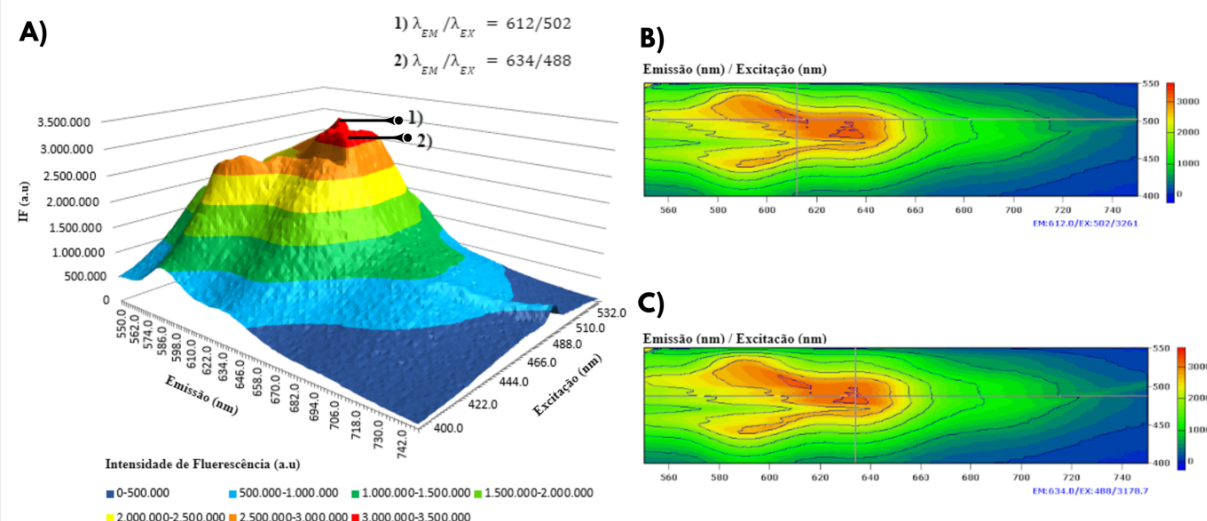
Entretanto para uma averiguação mais detalhada dos resultados obtidos, uma análise espectrofluorimétrica em modo 3D, foi realizada, a fim de se gerar uma mapa do qual correlaciona-se faixas de aquisição para os espectros de excitação, emissão e intensidade de fluorescência das amostras que continham os ativos livre e encapsulados, evidenciando que de fato, os arranjos espectrais dos ativos livres sofrem mudanças quando ao serem veiculadas no sistema nanoemulsionado devido a interação com os componentes nele presente e mudança do ambiente químico em questão (Figuras 17-20).

Figura 17. A) Mapa espectral 3D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade. C) Mapa espectral 2D da Doxorubicina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o segundo maior pico de intensidade.



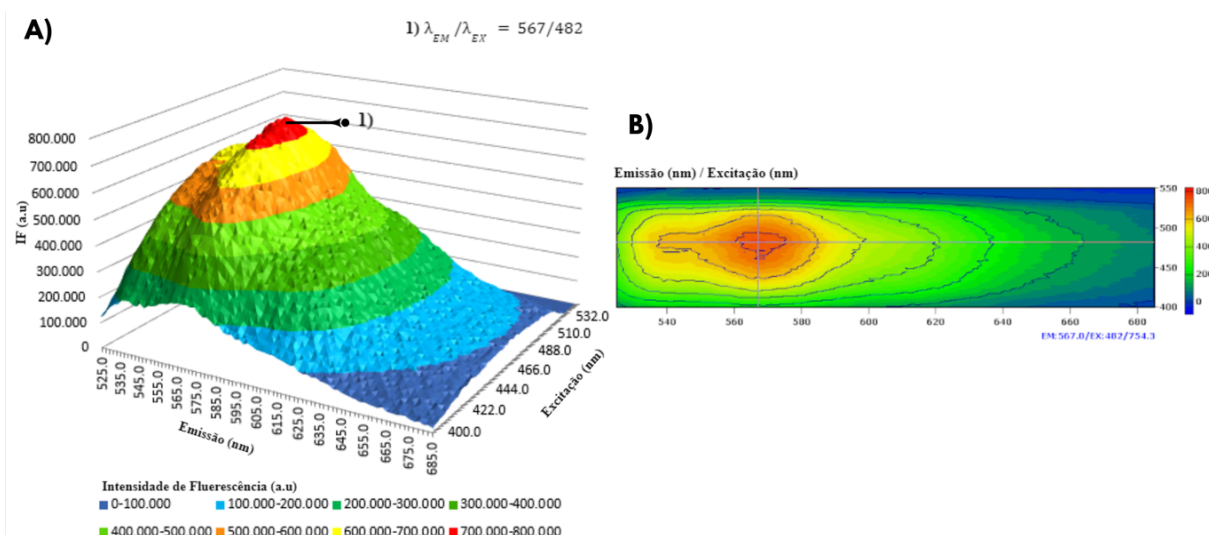
Fonte: Autor

Figura 18. A) Mapa espectral 3D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade. C) Mapa espectral 2D da NE/DOX, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o segundo maior pico de intensidade.



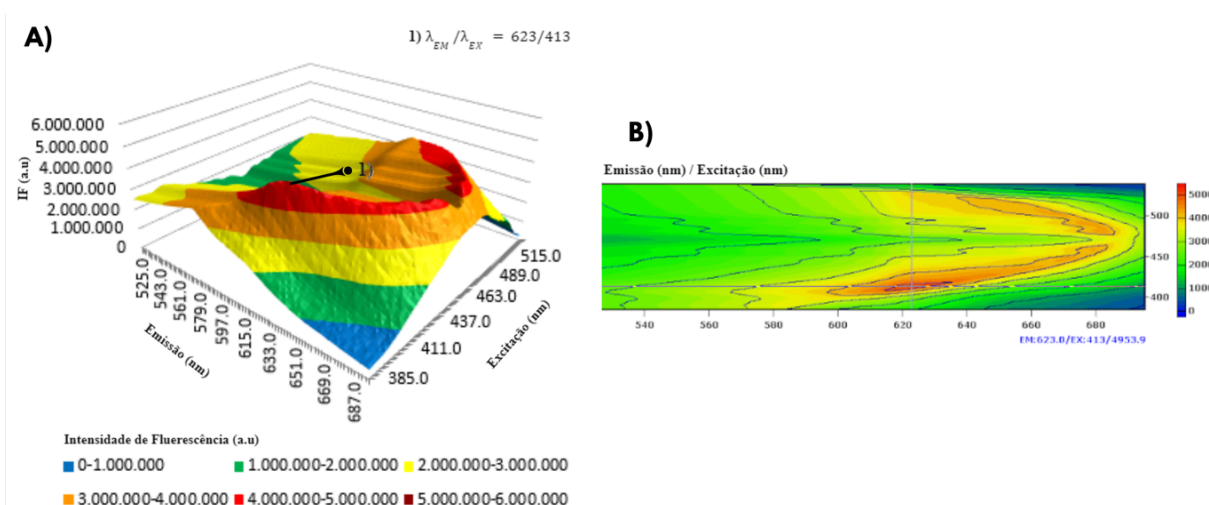
Fonte: Autor

Figura 19. A) Mapa espectral 3D da Quinizarina Livre, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da Quinizarina Livre, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade.



Fonte: Autor

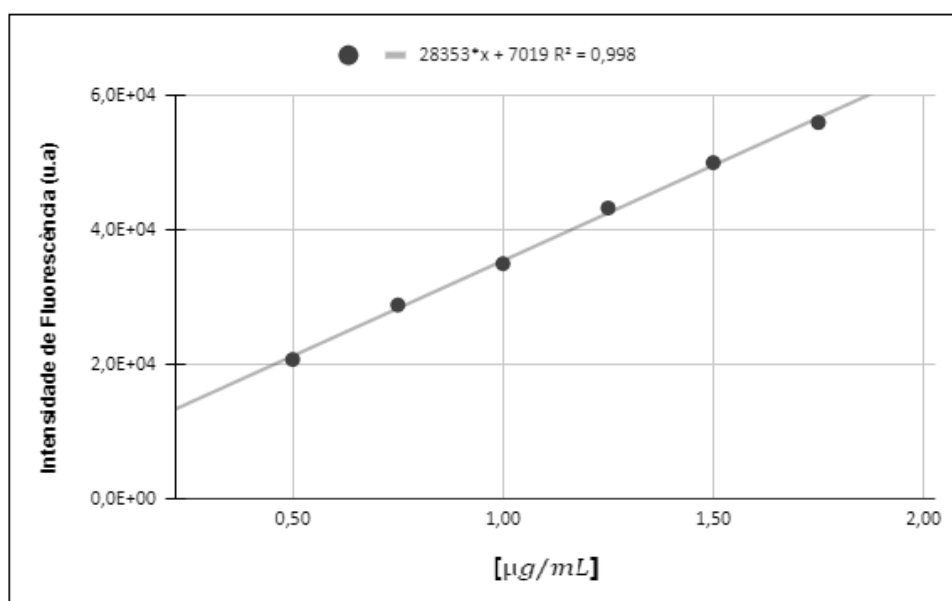
Figura 20. A) Mapa espectral 3D da NE/QNZ, correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. B) Mapa espectral 2D da NE/QNZ, correlacionando espectro de emissão e intensidade de fluorescência, evidenciando o maior pico de intensidade.



Fonte: Autor

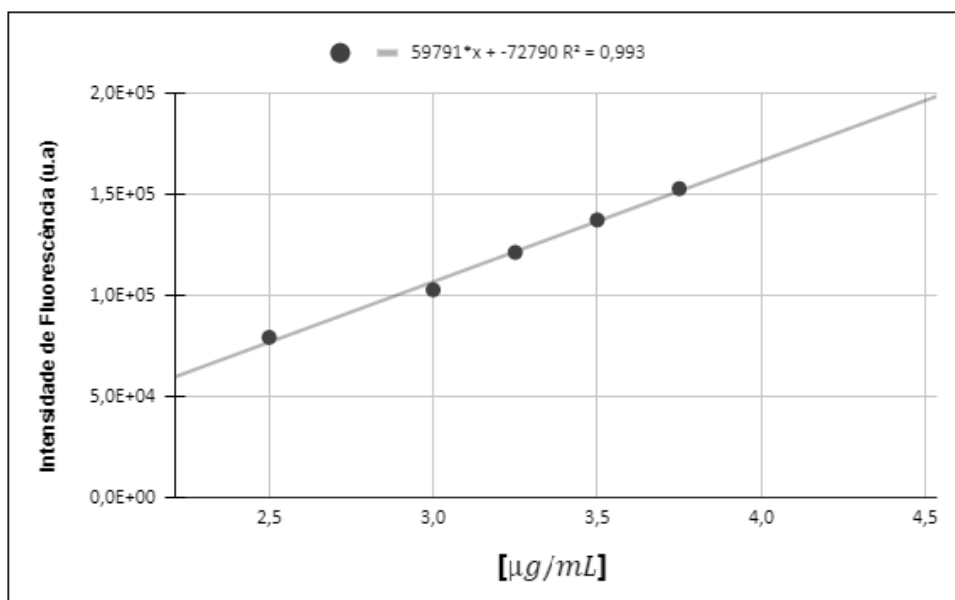
Após a caracterização espectroscópica inicial, equações para o cálculo de eficiência de encapsulação foram obtidas por regressão linear, utilizando valores médios dos pontos experimentais de máxima emissão em diferentes concentrações de cada ativo livre (DOX e QNZ), gerando gráficos (figuras 21 e 22), com equação de reta iguais a $28353 \cdot x + 7019$ e $59791 \cdot x - 72790$ com os coeficientes de determinação (R^2) iguais a 0,998 e 0,993, o que representa que a curva analítica possui um excelente ajuste linear para estabelecer um método analítico padrão, sendo esta uma metodologia analítica validada estatisticamente por Siqueira-Moura *et al.*, 2009.

Figura 21. Curva analítica da Doxorrubicina Livre em acetonitrila, sendo a emissão máxima em 590 nm, com excitação fica em 480 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.



Fonte: Autor.

Figura 22. Curva analítica da Quinizarina Livre em acetonitrila, sendo a emissão máxima em 570 nm, com excitação fica em 475 nm e fendas de resolução espectral de 5,0 nm e 5,0 nm respectivamente.



Fonte: Autor.

5.3 EFICIÊNCIA DE INCORPORAÇÃO

Com as curvas preparadas, o cálculo da concentração total do ativo foi realizado, através da digestão em triplicata de amostras de NE/DOX e NE/QNZ. Após digestão, as amostras foram lidas no espectrofluorímetro, para que fosse possível obter um valor de intensidade de fluorescência que através da curva analítica, seriam convertidos nos valores da concentração total do ativo associado nas formulações NE/QNZ e NE/DOX (Tabela 2).

Em concomitância, amostras das formulações NE/QNZ e NE/DOX, foram filtradas, conforme descrito no 4.1.1.4, para que assim pudesse ser mensurado a concentração do ativo que estaria presente no clarificado, ou seja, a concentração do ativo não incorporado. Para essa mensuração, as amostras filtradas também foram enviadas para leitura no espectrofluorímetro, das quais possuíram seus respectivos valores de intensidade de fluorescência, convertidos para concentração de ativo (Tabela 2).

Tabela 2. Representação dos valores obtidos para Intensidade de fluorescência das amostras digeridas ($IF_{NE\ digerida}$), Intensidade de fluorescência das amostras clarificada ($IF_{Solução\ Cl}$), concentração total do ativo em $\mu g/mL$ (C_t), concentração total do ativo não incorporado em $\mu g/mL$ (C_{NI}), Eficiência de Encapsulação (E_E) e Perda de ativo (P).

NE	$IF_{NE\ digerida}$	$IF_{Solução\ Cl}$	C_t	C_{NI}	$E_I(\%)$	$P(\%)$
NE/QNZ	94572,50 $\pm$ 6403,46	1071 $\pm$ 15,27	34,99 $\pm$ 1,33	4,94 $\pm$ 0,01	86	30
NE/DOX	42973,33 $\pm$ 565,93	15781,83 $\pm$ 85,25	15,85 $\pm$ 0,25	0,77 $\pm$ 0,01	95	68

Nota: As amostras representam a média e o desvio padrão para três medições.

Fonte: Autor.

Vale salientar que, devido ao conhecimento prévio da concentração teórica, cujo qual cada formulação deveria possuir (50 $\mu g/mL$ de QNZ para NE/QNZ e 50 $\mu g/mL$ de DOX para NE/DOX), foi possível realizar tanto os cálculos de eficiência quanto a porcentagem de perda dos respectivos ativos, nas formulações, por meio da Equação 1 e Equação 2.

Cálculo Eficiência de Encapsulação e Perda de ativo na formulação NE/DOX:

$$Eficiência\ de\ Encapsulação\ (\%) = \frac{C_t - Concentração_{NI}}{Concentração_T} \times 100 \quad (1)$$

$$Eficiência\ de\ Encapsulação\ (\%) = \frac{15,85\ \mu g/mL - 0,77\ \mu g/mL}{15,85\ \mu g/mL} \times 100 \quad (1)$$

$$Eficiência\ de\ Encapsulação\ (\%) \simeq 95\ \%$$

$$Perda\ (\%) = \left(\frac{Concentração_{Teórica\ do\ ativo} - Concentração_T}{Concentração_{Teórica\ do\ ativo}} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$Perda\ (\%) = \frac{50\ \mu g/mL - 15,85\ \mu g/mL}{50\ \mu g/mL} \times 100 \quad (2)$$

$$Perda (\%) \simeq 68\%$$

Cálculo Eficiência de Encapsulação e Perda de ativo na formulação NE/QNZ:

$$Eficiência de Encapsulação (\%) = \frac{C_T - Concentração_{NI}}{Concentração_T} \times 100 \quad (1)$$

$$Eficiência de Encapsulação (\%) = \frac{34,99 \mu g/mL - 4,94 \mu g/mL}{34,99 \mu g/mL} \times 100 \quad (1)$$

$$Eficiência de Encapsulação (\%) \simeq 86 \%$$

$$Perda (\%) = \left(\frac{Concentração_{Teórica do ativo} - Concentração_T}{Concentração_{Teórica do ativo}} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$Perda (\%) = \left(\frac{50 \mu g/mL - 33,99 \mu g/mL}{50 \mu g/mL} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$Perda (\%) \simeq 30\%$$

Estes ensaios são de grande importância para caracterização e quantificação dos ativos veiculados no sistema nanoemulsionado, evidenciando a alta capacidade de encapsulação da formulação utilizada, da qual foi capaz de encapsular $\simeq 95\%$ de DOX e $\simeq 86\%$ de QNZ. Um ponto importante de se considerar é de que apesar dos valores de perdas serem relativamente altos, esses valores refletem perdas relacionadas ao desenvolvimento das NE's, uma vez em que o ativo precisa ser aliquoteado e manipulado, gerando perdas por conta de resquícios, principalmente quando consideramos o fato que a DOX tende a ser mais hidrofílica, o que pode ter influenciado ainda mais no resultado de perda do ativo, já que ela foi incorporado em um meio hidrofóbico, mas o que torna o resultado interessante, é a eficiência de incorporação do ativo que estava realmente presente na formulação.

Outra consideração que deve ser realizada, é sobre a grande sobreposição do feixe espectral de absorção e emissão da DOX e QNZ como pode ser visualizado nas figuras 9-11, dessa forma, não sendo possível realizar o teste de eficiência de encapsulação para a NE/QNZ/DOX, ou seja, amostra mista, seguindo o mesmo protocolo utilizado para NE/QNZ e NE/DOX, uma vez que não teria como distinguir os ativos no pico espectral que seria gerado devido sua sobreposição, mas vale pressupor que ambos tiveram um alto índice de incorporação devido a performance dos mesmos separados.

5.4 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE EM MONOCAMADA EM HDFn

O teste de citotoxicidade das formulações desenvolvidas foi realizado na ausência de luz, sendo esse teste uma etapa preliminar para a avaliação da biocompatibilidade de formulações obtidas. Outro parâmetro que pode ser obtido pelo respectivo teste, é o de determinar a faixa de concentração adequada para administração *in vitro* dos agentes utilizados no presente trabalho, buscando garantir um intervalo de segurança biológica e com eficácia no tratamento do alvo biológico (Amantino *et al.*,2020). Estes estudos foram realizados empregando-se o teste de viabilidade celular com resazurina como descrito anteriormente na seção experimental 4.3.

Os resultados mostraram a ausência de citotoxicidade para todas as faixas de concentração avaliadas na ausência de luz de NE/QNZ. Nas formulações de NE/DOX e NE/QNZ/DOX, houve uma resposta citotóxica mais acentuada nas primeiras 3 horas, porém, seguidas de um reparo celular proeminente expresso através da vertiginosa proliferação celular que ocorreu nas horas seguintes em todos os grupos (Figura 23 a 31).

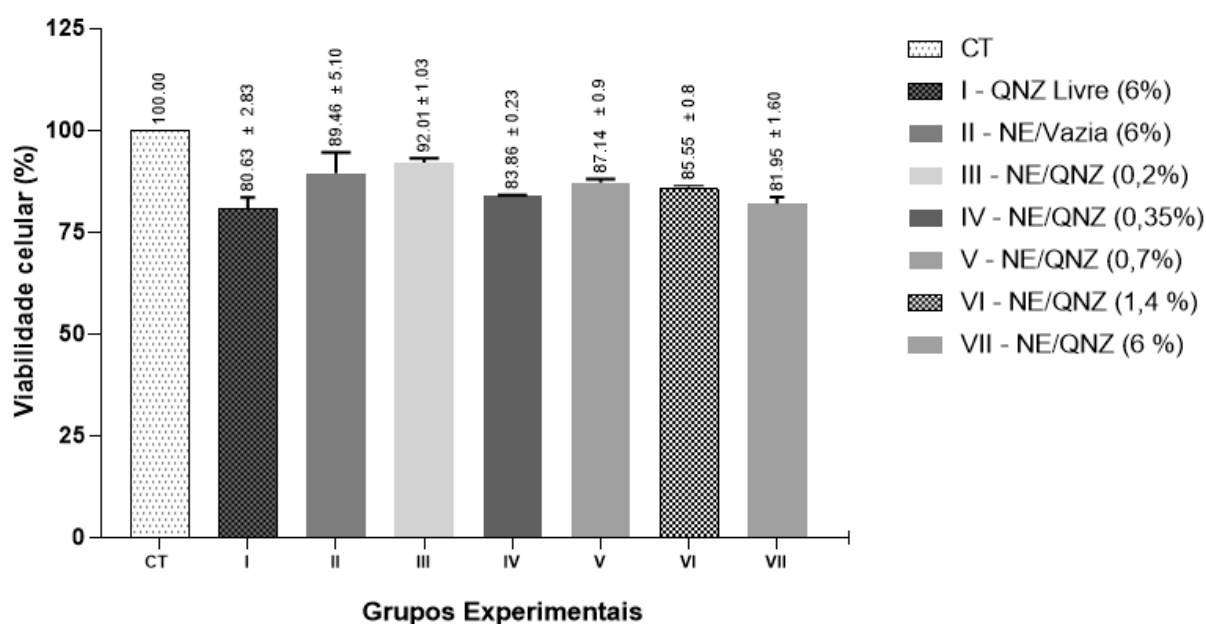
Essa rápida proliferação, se mostrou um resultado interessante já que os agentes utilizados modulam efeitos contrários ao fenômeno presenciado. A DOX, é capaz de se intercalar com o DNA e inibir a topoisomerase II da células-alvos gerando morte celular, assim como a QNZ, que além de conseguir realizar a mesma função, possui efeito na regulação da síntese de transglutaminase (TG; EC 2.3.2.13), proteína essa responsável pela atenuação da biossíntese de poliaminas, que por sua vez, são responsáveis por diversas funções biológicas como controle da divisão celular, estabilização de ácidos nucleicos, síntese e estabilização de proteínas assim como no controle de canais iônicos ou seja essenciais para a proliferação celular(Rossi *et al.*,2010; Hu *et al.*,2019).

Dessa forma, uma possível explicação para o rápido processo de reparo celular seguido de proliferação, foi a ocorrência de um feedback positivo intracelular, ou seja, a amplificação da biossíntese das proteínas que sofreram mudança e atenuação de sua produção por parte da QNZ e/ou DOX, gerando assim uma proliferação celular, já que as concentrações utilizadas não gerou morte celular generalizada, ou seja, esse resultado demonstra a biocompatibilidade do sistema

nanoestruturado nas concentrações utilizadas, onde apresentaram uma baixa citotoxicidade. Outro fator que vale ressaltar, é de que, alguns trabalhos como o de Teixeira *et al.* 2023, desenvolveram sistemas nanoestruturados onde trabalharam com concentrações molares no mínimo, 100 vezes maiores de DOX, obtendo assim um perfil citotóxico mais proeminentes mesmo com o passar de 48 horas, o que mais uma vez comprova o limiar de segurança trabalhado no presente estudo (Rossi *et al.*,2010; Hu *et al.*,2019).

Outra análise em relação aos resultados obtidos, refere-se ao potencial sinérgico conquistado pela associação da QNZ e DOX no sistema nanoemulsionado, uma vez que, já se é sabido que alguns medicamentos como curcumina e quercetina podem melhorar drasticamente o perfil de segurança e diminuir os efeitos colaterais da DOX quando combinados, dessa forma restando saber se apenas houve uma potencialização do efeito, já que a viabilidade nas primeiras 3 horas foi menor nesses grupos ou se a quinizarina também atenuaria os efeitos colaterais causados pela DOX com o tempo, necessitando assim de mais estudos (Akbaribazm *et al.*, 2020).

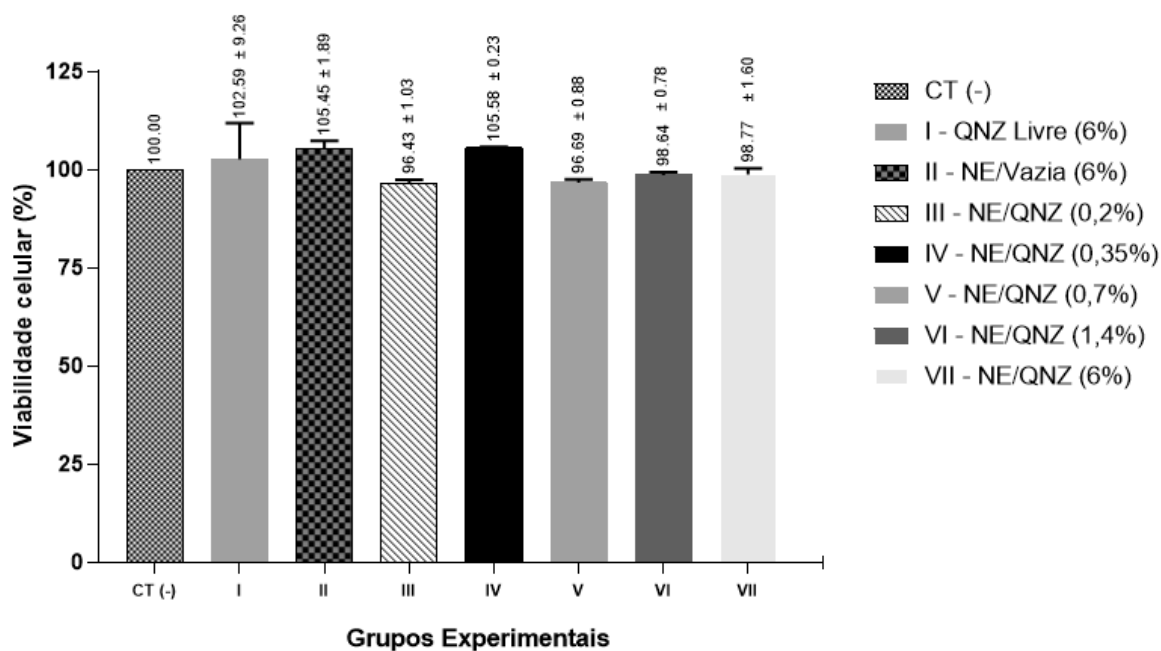
Figura 23. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: QNZ livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/QNZ (0,2% v/v); IV: NE/QNZ (0,35% v/v); V: NE/QNZ (0,7% v/v); VI: NE/QNZ (1,4% v/v) e VII: NE/QNZ (6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor.

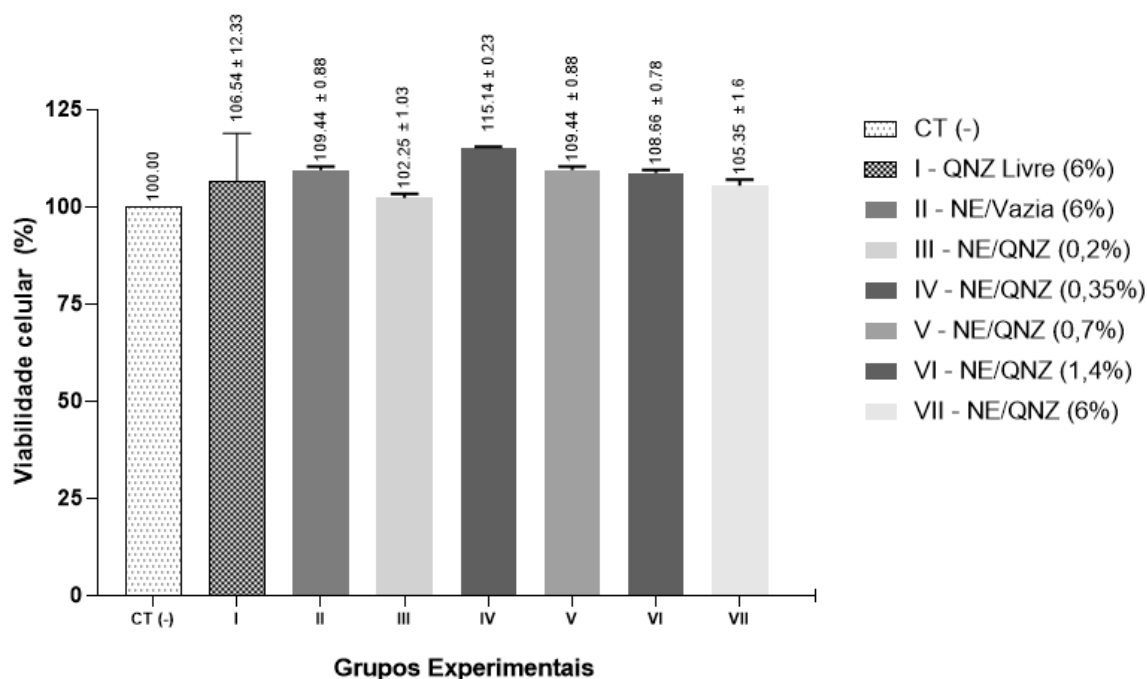
Figura 24. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: QNZ livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/QNZ (0,2% v/v); IV: NE/QNZ (0,35% v/v); V: NE/QNZ (0,7% v/v); VI: NE/QNZ (1,4% v/v) e VII: NE/QNZ (6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

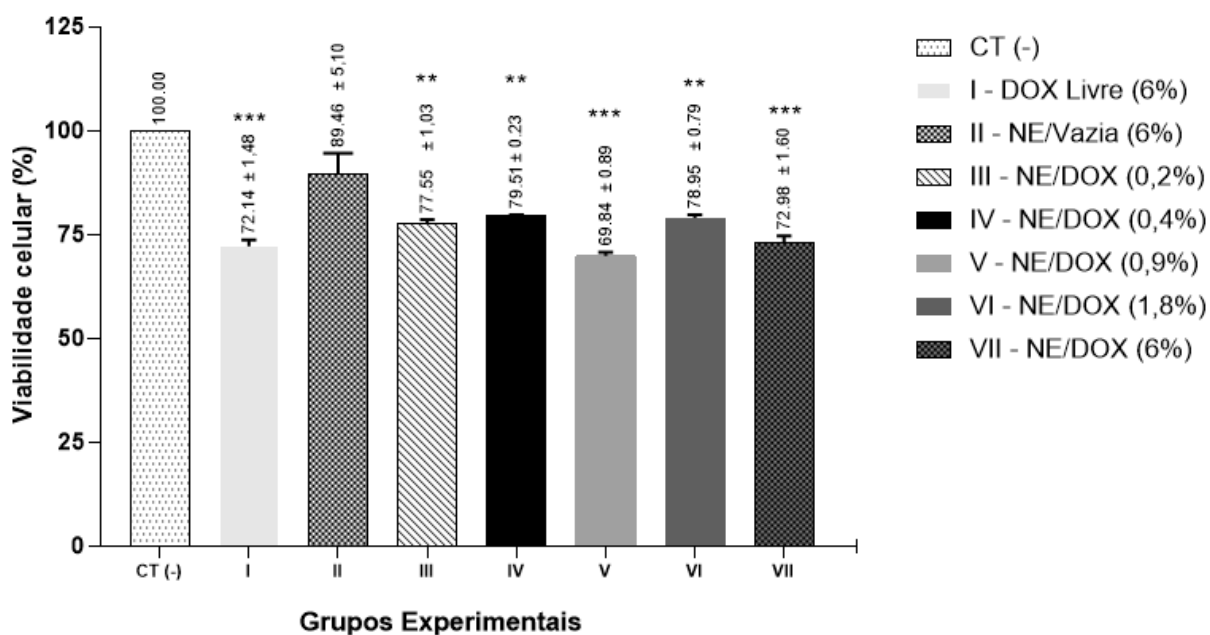
Figura 25. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) livre e nanoemulsionada (NE/QNZ) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: QNZ livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/QNZ (0,2% v/v); IV: NE/QNZ (0,35% v/v); V: NE/QNZ (0,7% v/v); VI: NE/QNZ (1,4% v/v) e VII: NE/QNZ (6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

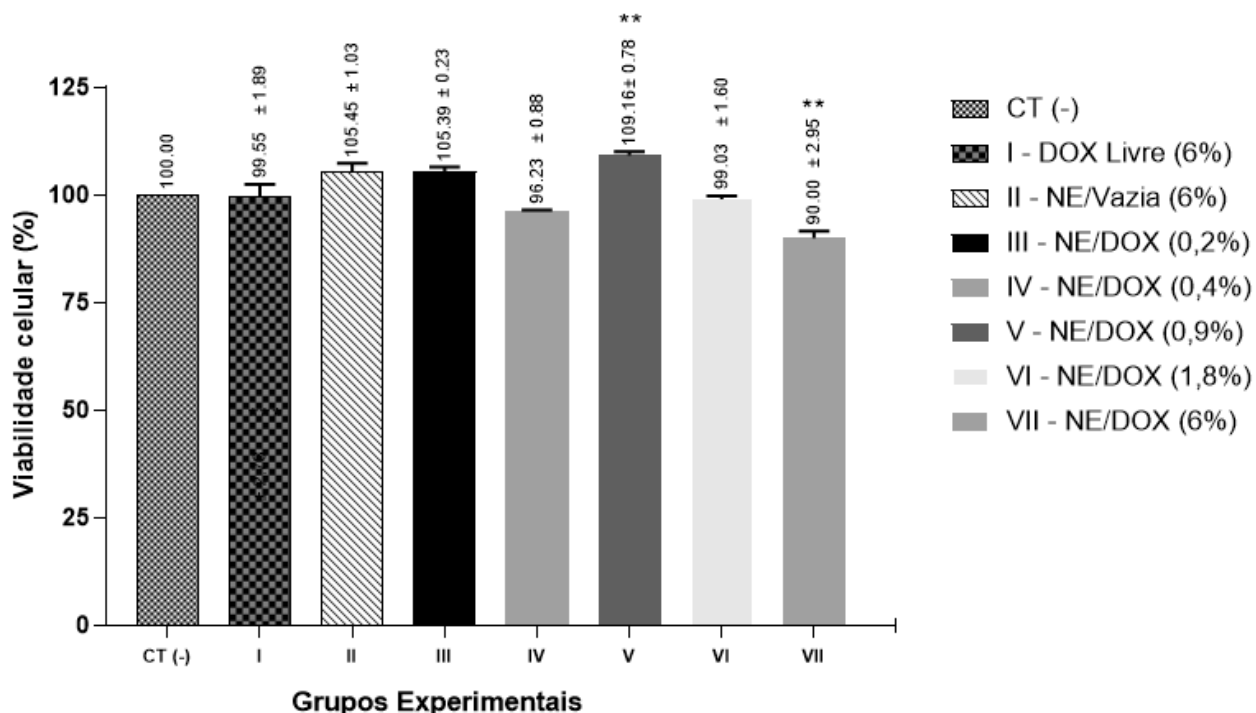
Figura 26. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de doxorubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: DOX livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/DOX (0,2% v/v); IV: NE/DOX (0,4% v/v); V: NE/DOX (0,9% v/v); VI: NE/DOX (1,8% v/v) e VII: NE/DOX(6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

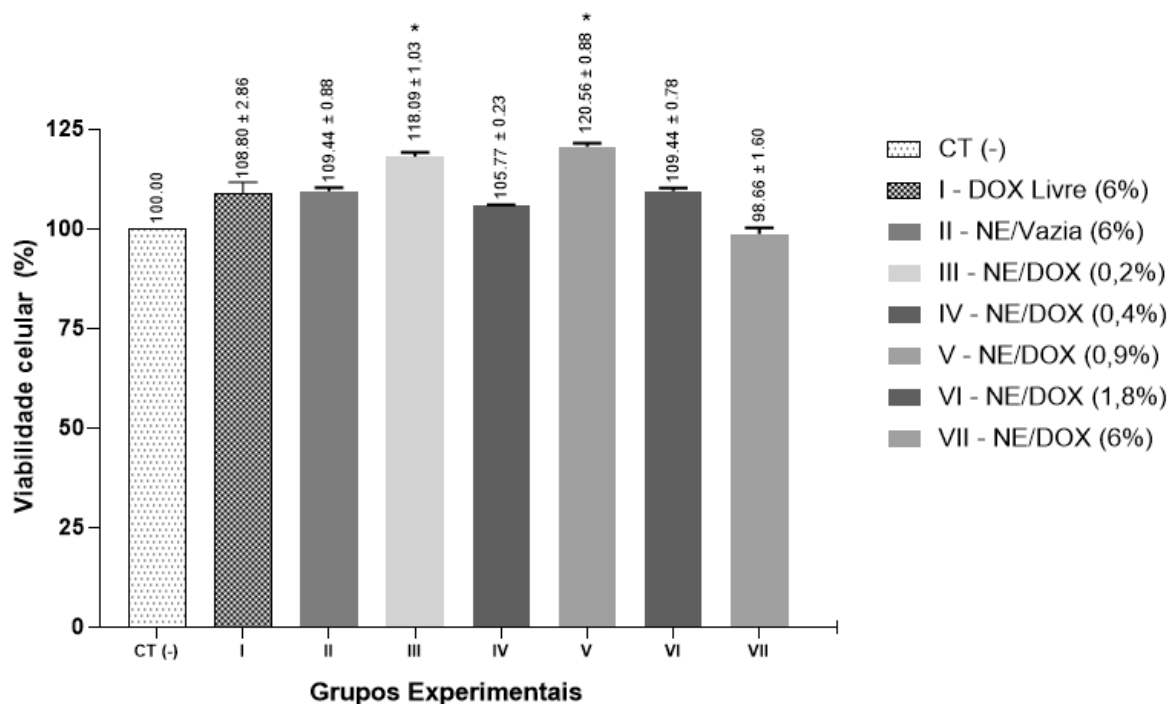
Figura 27. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de doxorrubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: DOX livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/DOX (0,2% v/v); IV: NE/DOX (0,4% v/v); V: NE/DOX (0,9% v/v); VI: NE/DOX (1,8% v/v) e VII: NE/DOX (6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

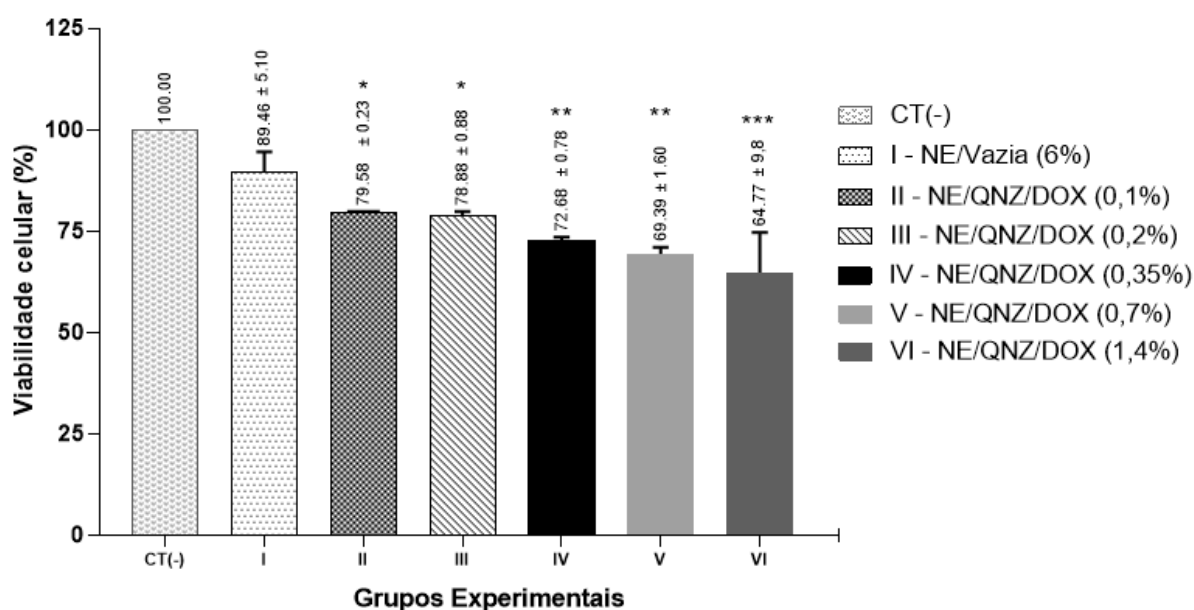
Figura 28. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de doxorubicina (DOX) livre e nanoemulsionada (NE/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: DOX livre diluída (6% v/v); II: NE vazia diluída (6% v/v); III: NE/DOX (0,2% v/v); IV: NE/DOX (0,4% v/v); V: NE/DOX (0,9% v/v); VI: NE/DOX (1,8% v/v) e VII: NE/DOX (6% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

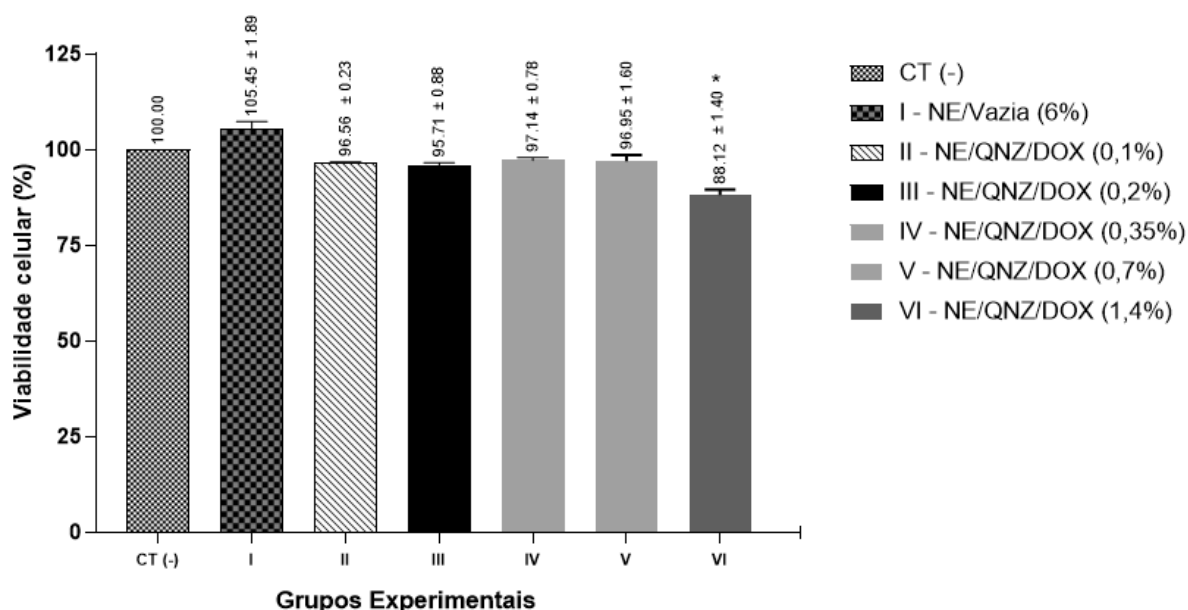
Figura 29. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) e doxorrubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 3h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: NE vazia diluída (6% v/v); II: NE/QNZ/DOX (0,1% v/v); III: NE/QNZ/DOX (0,2% v/v); IV: NE/QNZ/DOX (0,35% v/v); V: NE/QNZ/DOX (0,7% v/v); VI: NE/QNZ/DOX (1,4% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor.

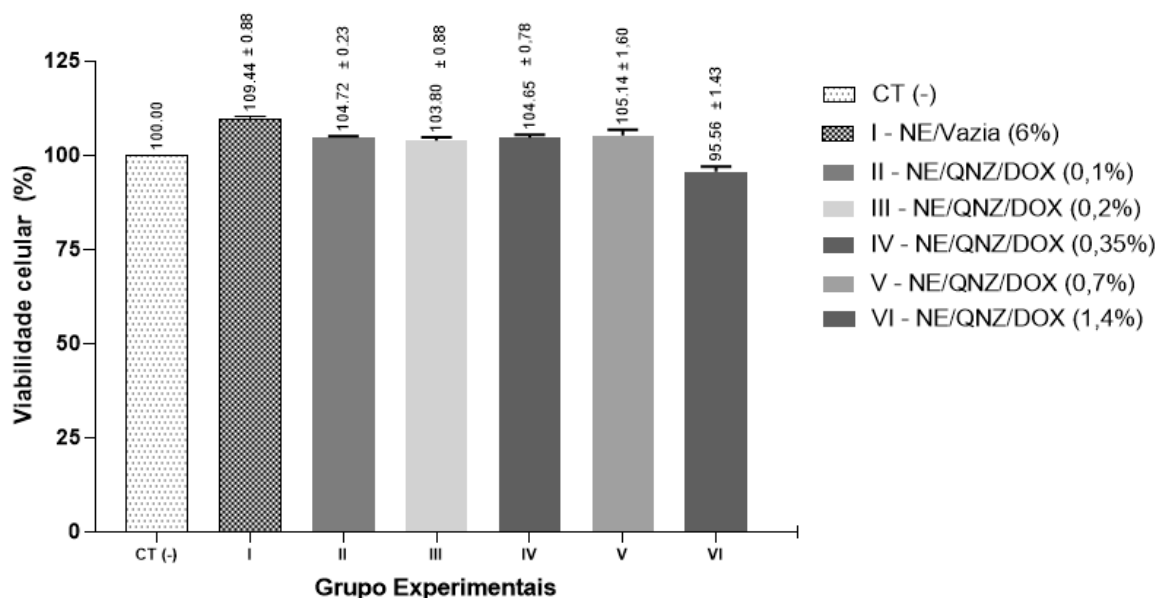
Figura 30. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) e doxorrubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 24h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: NE vazia diluída (6% v/v); II: NE/QNZ/DOX (0,1% v/v); III: NE/QNZ/DOX (0,2% v/v); IV: NE/QNZ/DOX (0,35% v/v); V: NE/QNZ/DOX (0,7% v/v); VI: NE/QNZ/DOX (1,4% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

Figura 31. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de quinizarina (QNZ) e doxorrubicina (DOX) nanoemulsionados (NE/QNZ/DOX) em linhagem de fibroblastos humanos primários, neonatal HDFn (ATCC® PCS-201-010™) durante 48h em ausência de luz utilizando resazurina.



CT: Controle; I: NE vazia diluída (6% v/v); II: NE/QNZ/DOX (0,1% v/v); III: NE/QNZ/DOX (0,2% v/v); IV: NE/QNZ/DOX (0,35% v/v); V: NE/QNZ/DOX (0,7% v/v); VI: NE/QNZ/DOX (1,4% v/v). Os valores foram expressos como porcentagem de viabilidade celular (média ± desvio padrão). Foi aplicada a análise estatística (ANOVA ONE-WAY) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em relação ao controle 100%).

Fonte: Autor

6. CONCLUSÃO

Diante do trabalho apresentado, conclui-se que o sistema nanoemulsionado apresentou resultados promissores, dessa forma sendo possível desenvolver e caracterizar o sistema nanoemulsionado proposto. Os resultados obtidos pelas análises, foram extremamente satisfatórios, uma vez que a NE/QNZ/DOX, o arranjo principal estudado, apresentou o tamanho de $180,8 \pm 8,3$ nm, ideal para permear entre células cancerígenas, potencial zeta $-23,33 \pm 4,10$, e IPD de $0,186 \pm 0,134$, o que indica um sistema monodisperso e ideal para se manter estável.

A caracterização fotofísica demonstrou irrelevante influência do sistema nanoemulsionado nos picos de máxima absorção, fator esse fundamental para uma boa desenvoltura do arranjo proposto durante a TFD além dos altos índices de incorporação (uma vez que, o ensaio de eficiência de incorporação demonstrou a

alta capacidade do sistema em incorporar cerca de $\approx 95\%$ de DOX e $\approx 86\%$ de QNZ).

Os ensaios *in vitro* de segurança demonstraram alta biocompatibilidade, etapa irrevogável para se estabelecer e/ou propor algum novo medicamento ou bioproduto para utilização terapêutica. Por conseguinte, o conjunto de dados positivos contribuíram para uma boa perspectiva de que o sistema poderá possuir uma boa desenvoltura, estabilidade e eficiência na entrega/acúmulo destes ativos nas células alvos, tornando as formulações aqui desenvolvidas, arranjos inovadores e com grande potencial fototerapêutico sinérgico (fotodinâmico e quimioterápico), para o objetivo de viabilizar um novo arranjo categórico com potencial efeito terapêutico contra câncer oral avançado por fotodinâmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASIAN, Z.; ZHOU, M.; FOUDAZI, R. Nanoemulsion polymerization and templating: Potentials and perspectives. **Journal of Applied Physics**, v. 131, n. 15, p. 150902, 2022.
- AHMAD, A. *et al.* Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 8, p. 1113-1126, 2019.
- AIRES-FERNANDES, M. *et al.* Development of Biotechnological Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Cancer Research and Treatment—From Benchtop to Clinical Practice. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6848, 2022.
- AKBARIBAZM, M. *et al.* Doxorubicin and Trifolium pratense L.(Red clover) extract synergistically inhibits brain and lung metastases in 4T1 tumor-bearing BALB/c mice. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5557-5570, 2020.
- AMANTINO, C. F. *et al.* Anthraquinone encapsulation into polymeric nanocapsules as a new drug from biotechnological origin designed for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 31, p. 101815, 2020.
- ANTONOW, M. B. *et al.* Arginylglycylaspartic acid-surface-functionalized doxorubicin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to target alpha (V) beta (3) integrin expressed on tumor cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 1, p. 2, 2017.
- ASHAOLU, T. J. Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 3381-3395, 2021.
- BISWAL, S. *et al.* Tumour microenvironment and aberrant signaling pathways in cisplatin resistance and strategies to overcome in oral cancer. **Archives of Oral Biology**, v. 151, p. 105697, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105697>. Acesso em: 02 mar.2024.
- BRITO, V. B. *et al.* Efeito Cardioprotetor da Suplementação Materna com Resveratrol sobre a Toxicidade Induzida por Doxorubicina em Cardiomiócitos de Neonatos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 1147-1158, 2021
- BRUCH, J. M. *et al.* **Clinical oral medicine and pathology**. New York: Humana Press, 2010.
- CABRAL, A. S. *et al.* Combined photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin nanoemulsions in breast cancer model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 218, p. 112181, 2021.
- CHATTERJEE, A.; LASKAR, S. G.; CHAUKAR, D. Management of early oral cavity squamous cancers. **Oral Oncology**. v. 104, p. 104627, 2020.

DANAEI, M. *et al.* Impact of ParticleSize and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**. v. 10, n. 2, p. 1-17, 2018

DE OLIVEIRA, D. F. G.; CAVALCANTE, D. R. A.; FEITOSA, S. G. Qualidade de vida dos pacientes com câncer oral: revisão integrativa da literatura. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 19, n. 1, 2020

DORĐEVIĆ, S. *et al.* Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 3, p. 500–525, 23 jul. 2021.

DUVAL, K. *et al.* Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017.

EVANGELISTA, *et al.* Copolymer-nanocapsules of zinc phenyl- thio-phthalocyanine and amphotericin-B in association with antimicrobial photodynamic therapy (A-PDT) applications against *Candida albicans* yeasts. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 34, p. 102273, 2021.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; MANCHANDA, R.; KUMARI, M. Lipid-engineered nanotherapeutics for cancer management. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1125093, 2023.

FORNER, D. *et al.* Nonsurgical management of resectable oral cavity cancer in the wake of COVID-19: a rapid review and meta-analysis. **Oral oncology**, v. 109, p. 104849, 2020.

GABBY, M. E.; BUGIN, K.; LYONS, E. the evolution of endpoint assessments for chemotherapy-induced nausea and vomiting and post-operative nausea and vomiting—a perspective from the US Food and Drug Administration. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 54, n. 1, p. 7-13, 2021.

GHALWASH, D. M. Diagnostic and prognostic value of salivary biomarkers in oral cancer and precancer. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 32, n. 6, p. 538-543, 2020.

GIGLIOTTI, J.; MADATHIL, S.; MAKHOUL, N. Delays in oral cavity cancer. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.48, p.1131-1137, 2019.

HU, X. *et al.* Design and synthesis of various quinizarin derivatives as potential anticancer agents in acute T lymphoblastic leukemia. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1362-1369, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Tipos de câncer. **Câncer de boca**. Rio de Janeiro: INCA, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/boca>. Acesso em : 02 out.2024.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological evaluation of medical devices (ISO 10993-5) International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 2009

IRFAN, A. *et al.* Benzothiazole derivatives as anticancer agents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 265-279, 2020.

KALYANE, D. *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering: C**, v. 98, p. 1252-1276, 2019.

KOZSUP, M. *et al.* Synthesis, characterization and albumin binding capabilities of quinizarin containing ternary cobalt (III) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 204, p. 110963, 2020.

KOPUSTINSKIENE, D. M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 457, 2020.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LI, M. *et al.* Docetaxel-loaded ultrasmall nanostructured lipid carriers for cancer therapy: In vitro and in vivo evaluation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 85, p. 731-739, 2020.

LI, Y. *et al.* Nanotechnology-based photoimmunological therapies for cancer. **Cancer letters**, v. 442, p. 429-438, 2019.

LIANG, J. *et al.* Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay. **RSC advances**, v. 8, n. 28, p. 15621-15631, 2018

MALHÃO, F. *et al.* Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Preussin, a Hydroxypyrrolidine Derivative from the Marine Sponge-Associated Fungus *Aspergillus candidus* KUFA 0062, in a Panel of Breast Cancer Cell Lines and Using 2D and 3D Cultures. **Marine Drugs**, v. 17(8), p. 448, 2019.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer Nano Series User Manual**. 11ed. Worcestershire. United Kingdom: Malvern, 2013.

NIRMALA, M. J. *et al.* Cancer nanomedicine: a review of nano-therapeutics and challenges ahead. **RSC Advances**, v. 13, n. 13, p. 8606–8629, 2023.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro: Fiocruz, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020.

REE, J. *et al.* Quinizarin suppresses the differentiation of adipocytes and lipogenesis in vitro and in vivo via downregulation of C/EBP-beta/SREBP pathway. **Life Sciences**, v. 287, p. 120131, 2021.

RIVAS-SÁNCHEZ, A. K. *et al.* Quinizarin characterization and quantification in aqueous media using UV-VIS spectrophotometry and cyclic voltammetry. **Dyes and Pigments**, v. 184, p. 108641, 2021.

RODRÍGUEZ, F. *et al.* Nano-based approved pharmaceuticals for cancer treatment: present and future challenges. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 784, 2022.

ROSSI, S. *et al.* Anthraquinones danthron and quinizarin exert antiproliferative and antimetastatic activity on murine B16-F10 melanoma cells. **Anticancer research**, v. 30, n. 2, p. 445-449, 2010.

SABIR, F. *et al.* How to face skin cancer with nanomaterials: A review. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 11, p. 11931-11955, 2021.

SAINI, R. *et al.* Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions. **Cancers**. v. 8(9), p. 83, 2016.

SAUTROT-BA, P. *et al.* Quinizarin derivatives as photoinitiators for free-radical and cationic photopolymerizations in the visible spectral range. **Macromolecules**, v. 53, n. 4, p. 1129-1141, 2020.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. **International journal of oncology**, v. 54, n. 2, p. 407-419, 2019.

SHA, J. *et al.* Overview of evidence-based chemotherapy for oral cancer: focus on drug resistance related to the epithelial-mesenchymal transition. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 893, 2021.

SHAN, X. *et al.* Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 12, n. 7, mar. 2022.

SILVESTRE, A. L. P. *et al.* Current applications of drug delivery nanosystems associated with antimicrobial photodynamic therapy for oral infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120078, 2021.

SINGH, K. *et al.* Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity–Exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p. 177-190, 2018.

SIQUEIRA-MOURA, *et al.* Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, **Die Pharmazie**, v. in press, 2009.

STÁJER, A. *et al.* Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dentistry journal**. v. 8(2), p. 43, 2020.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA. **Cancer J. Clin.**, 2021.

TEIXEIRA, P. V. *et al.* pH-Responsive Hybrid Nanoassemblies for Cancer Treatment: Formulation Development, Optimization, and In Vitro Therapeutic Performance. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 326, 2023.

TENCHOV, R. *et al.* Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. **ACS Nano**, v. 15, n. 11, 28 jun. 2021.

THEOCHARI, L.; XENAKIS, A.; PAPADIMITRIOU, V. Nanocarriers for effective drug delivery. In: Smart Nanocontainers. **Elsevier**, p. 315-34, 2020.

VÁZQUEZ, M. F. B. *et al.* Reprint of “Experimental measurement and modeling of quinizarin solubility in pressurized hot water”. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 63-74, 2017.

WANG, M. *et al.* Recent advances in mechanism-based chemotherapy drug-siRNA pairs in co-delivery systems for cancer: a review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 297-308, 2017.

WILSON, R. J. *et al.* Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v. 64, p. 85-97, 2022.

ZANONI, D. K.; PATEL, S. G. New AJCC: How does it impact oral cancers?. **Oral oncology**, v. 104, p. 104607, 2020

ZHANG, H. *et al.* Rhein induces oral cancer cell apoptosis and ROS via suppresses AKT/mTOR signaling pathway in vitro and in vivo. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 10, p. 8507, 2023.

ZHOU, T. *et al.* A review of algorithmic approaches for cell culture media optimization. v. 11, 11 maio 2023.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules Basel**, v. 25 (16), p.3731,2020.